DER MEDIZINISCHE BLUTEGEL UND SEINE WIRKSTOFFE

Eine Übersicht

Carola Barbara Jopen-Wolff

Diss
München
1984

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München
Leitung: Prof. Dr. Hans Fritz

DER MEDIZINISCHE BLUTEGEL UND SEINE WIRKSTOFFE

Eine Übersicht

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Carola Barbara Jopen-Wolff

aus
Dresden

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Zur Behandlung mit medizinischen Blutegeln..... 1

1.2 Vorkommen und Biologie des Blutegels..... 3

1.3 Physiologie der Blutgerinnung..... 6

1.4 Protein-Inhibitoren der Serinproteasen..... 8

2. Die Wirkstoffe von Hirudo medizinalis

2.1 Hirudin..... 12

2.1.1 Isolierung und Reingewinnung..... 12

2.1.2 Charakterisierung des Hirudins..... 31

2.1.2.1 Chemische und physikalische Eigenschaften..... 34

2.1.2.2 Aminosäurezusammensetzung..... 38

2.1.2.3 Endgruppen-Identifizierung..... 40

a) N-terminale Aminosäure..... 40

b) C-terminale Aminosäure..... 42

2.1.2.4 Primärstruktur des Hirudins..... 43

2.1.3 Wirkspektrum des Hirudins..... 47

2.1.3.1 Inhibitorwirkung gegen Thrombin..... 47

2.1.3.1.1 Antithrombinaktivität von chemisch modifiziertem Hirudin..... 50

2.1.3.1.2 Affinität des Hirudins zu chemisch modifiziertem Thrombin..... 52

Hirudineffekt und

a) Esterase-Thrombin..... 52

b) DIP-Thrombin..... 53

c) inaktiviertes Thrombin (mittels 4-Amidinobenzolsulfofluorid und 4-(2-Aminoäthyl)benzolsulfofluorid)... 54

d) Thrombin-Proflavin-Komplex..... 54

2.1.3.1.3 Hemmechanismus - das reaktive Zentrum..... 55

2.1.3.1.4 Hirudineffekt auf thrombininduzierte Reaktionen im Gerinnungsablauf:..... 57

a) die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin..... 58

b) die Aktivierung des Faktor XIII..... 58

c) die Aktivierung des Faktor VIII..... 59

d) die Thrombokinasebildung (Plasma-thromboplastin)..... 60

e) die Aktivierung des Faktor VII und V.. 61

f) die Thrombozytenreaktionen..... 61

2.1.3.1.5 Einfluß des Hirudins auf die fibrinolytische Aktivität des Thrombins..... 63

Effekte des Hirudins auf:

2.1.3.2 Intermediat 2..... 64

2.1.3.3 Faktor IXa..... 64

2.1.3.4 die Thrombin-Antithrombin-Reaktion..... 65

2.1.3.5 Autoprothrombin C..... 65

2.1.3.6 nicht durch Faktor Xa aktivierte Thrombine.... 65

2.1.4 Pharmakokinetische, pharmakodynamische u.a. Eigenschaften des Hirudins..... 66

2.1.4.1 Resorption, Ausscheidung, Clearance..... 66

2.1.4.2 Toxizität..... 68

2.1.4.3 Anwendung für gerinnungsphysiologische und gerinnungsdiagnostische Studien..... 68

2.1.4.3.1 Bestimmungsmethode für Hirudin..... 69

2.1.4.3.2 Quantitative Bestimmung des Thrombins und Prothrombins..... 70

2.1.4.3.3 "Hirudintest"..... 71

2.1.4.3.4 Hirudintoleranztest..... 73

2.1.4.3.5 Aktivitätsbestimmung des Thrombins mit chromogenen Substraten..... 75

2.1.4.3.6 Anwendung des Hirudins zum Studium einiger Thrombozytenreaktionen..... 77

2.1.4.3.7 Anwendung des Hirudins für spezielle Untersuchungen..... 80

2.1.5 Anwendung des Hirudins zur Thromboseprophylaxe und -therapie..... 81

2.1.5.1 Protektiver Effekt bei experimentell induzierter erhöhter Gerinnungsneigung..... 81

a) antithrombotische Wirkung..... 81

b) Einfluß auf die disseminierte intravasale Gerinnung..... 83

2.1.5.2 Erfahrungen über die aktive und passive Hirudinisierung beim Menschen..... 88

2.2 Pseudohirudin..... 92

2.2.1 Isolierung..... 93

2.2.2 Charakterisierung..... 95

2.2.2.1 N-terminale Aminosäurereste..... 97

2.2.2.2 Aminosäurezusammensetzung..... 98

2.3 Bdelline..... 99

2.3.1 Isolierung..... 99

2.3.2 Charakterisierung.....103

2.3.2.1 Aminosäurezusammensetzung.....104

2.3.2.2 Aminosäuresequenz von Bdellin B-3 und strukturelle Homologien.....107

2.3.3 Hemmspektrum - Inhibitoraktivität gegenüber Trypsin, Plasmin und Akrosin.....109

2.3.4 Potentielle Anwendungsbereiche.....113

2.4 Egline.....114

2.4.1 Isolierung 114

2.4.2 Charakterisierung.....116

2.4.2.1 Aminosäurezusammensetzung.....117

2.4.2.2 Endgruppen.....118

2.4.2.3 Primärstruktur von Eglin c.....119

2.4.3 Wirkspektrum.....123

2.4.3.1 Hemmechanismus - Interaktion mit Chymotrypsin.....124

2.4.3.2 Inhibitorwirkung gegen die Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G.....125

2.4.4 Potentielle Anwendungsbereiche.....127

3. Zusammenfassende Darstellung.....129

4. Literaturverzeichnis.....138

Danksagung.....153

Lebenslauf.....154

1. Einleitung

1.1 Zur Behandlung mit medizinischen Blutegeln

Der medizinische Blutegel spielt kulturgeschichtlich eine nicht unbedeutende Rolle. Über Jahrhunderte wurden die Egel zur Blutentziehung in der Heilkunde bei den vielfältigsten Krankheitsbildern und auch zur Erfüllung mystischer Vorstellungen angewandt.

Die in der Literatur erwähnte erste Behandlung mit Blutegeln geht in das 2. Jh.v.Chr. zurück. Der griechische Arzt Nikander von Colophon (200-131 v.Chr.) setzte Egel bei Stichen und Bissen giftiger Tiere lokal an. Thermison von Laodicec (1. Jh.v.Chr.) verwendete sie zur Behandlung von chronischen Erkrankungen, vor allem bei Kopfleiden. Galen aus Kapadozien (130-201 n.Chr.) empfahl Blutentziehungen durch Schröpfköpfe und Blutegel zur "Ableitung von Säften oder Beseitigung von Säftestockungen" bei Augenentzündungen, Nasenbluten, Amenorrhoe und Metrorrhagien. Sein Schüler, der Chirurg Antyllus (3. Jh.n.Chr.) präzisierte die Indikation und Technik der Therapie mit Blutegeln, u.a. wie die Blutung gefördert oder gestillt werden könne und weist auf Komplikationen wie Vergiftungen hin. Ähnliche Angaben wurden bei Oreibasios (4.Jh. n.Chr.), Leibarzt von Julian Apostata aus Byzanz, gefunden /86,19/.

Im Mittelalter wurde der Blutegel zunehmend zu vielerlei Heilzwecken nicht nur von Ärzten sondern auch von Quacksalbern, Badern und Laien, die sie im Hause hielten, verwendet. Stephan Blancard schrieb hierzu 1688 in der "Neuen Kunstkammer der Chirurgie":

"Sie werden an alle Oerter des Leibes gesetzet/ fürnemlich aber an die/ denen man mit Aderlassen oder Schröpffen nicht kan beykommen/ als: An die Augenlieder/ Nase/ Mund/ Lippen/

2.4.3 Wirkspektrum.....123

2.4.3.1 Hemmechanismus - Interaktion mit Chymotrypsin.....124

2.4.3.2 Inhibitorwirkung gegen die Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G.....125

2.4.4 Potentielle Anwendungsbereiche.....127

3. Zusammenfassende Darstellung.....129

4. Literaturverzeichnis.....138

Danksagung.....153

Lebenslauf.....154

1. Einleitung

1.1 Zur Behandlung mit medizinischen Blutegeln

Der medizinische Blutegel spielt kulturgeschichtlich eine nicht unbedeutende Rolle. Über Jahrhunderte wurden die Egel zur Blutentziehung in der Heilkunde bei den vielfältigsten Krankheitsbildern und auch zur Erfüllung mystischer Vorstellungen angewandt.

Die in der Literatur erwähnte erste Behandlung mit Blutegeln geht in das 2. Jh.v.Chr. zurück. Der griechische Arzt Nikander von Colophon (200-131 v.Chr.) setzte Egel bei Stichen und Bissen giftiger Tiere lokal an. Thermison von Laodicec (1. Jh.v.Chr.) verwendete sie zur Behandlung von chronischen Erkrankungen, vor allem bei Kopfleiden. Galen aus Kapadozien (130-201 n.Chr.) empfahl Blutentziehungen durch Schröpfköpfe und Blutegel zur "Ableitung von Säften oder Beseitigung von Säftestockungen" bei Augenentzündungen, Nasenbluten, Amenorrhoe und Metrorrhagien. Sein Schüler, der Chirurg Antyllus (3. Jh.n.Chr.) präzisierte die Indikation und Technik der Therapie mit Blutegeln, u.a. wie die Blutung gefördert oder gestillt werden könne und weist auf Komplikationen wie Vergiftungen hin. Ähnliche Angaben wurden bei Oreibasios (4.Jh. n.Chr.), Leibarzt von Julian Apostata aus Byzanz, gefunden /86,19/.

Im Mittelalter wurde der Blutegel zunehmend zu vielerlei Heilzwecken nicht nur von Ärzten sondern auch von Quacksalbern, Badern und Laien, die sie im Hause hielten, verwendet. Stephan Blancard schrieb hierzu 1688 in der "Neuen Kunstkammer der Chirurgie":

"Sie werden an alle Oerter des Leibes gesetzet/ fürnemlich aber an die/ denen man mit Aderlassen oder Schröpffen nicht kan beykommen/ als: An die Augenlieder/ Nase/ Mund/ Lippen/

Zahnfleisch/ männlichen Ruthe/ Finger/ Zähen/ Warzen der Brüste/ weiblichen Gebuhrts-Gliedern/ etc. Man hält dafür/ daß der Blutsäuger-Gebrauch an statt des Schröpffen erfunden sey. Ich dürffte aber fast glauben/ daß die Erfindunge zufälliger Weise geschehen/ indeme sie sich an die Füße der Knaben/ so zu Zeiten in den Wassern schwimmen/ gesetzet/und ist es glaubwürdig/ daß ihr Gebrauch dahero eingeführet." /19/

Johann Pringle berichtet in "Beobachtungen über die Krankheiten einer Armee" (1754) über Heilerfolge bei Gelenksentzündungen durch frühzeitige Lokalapplikationen von Blutegeln sowie bei Meningitis und der fieberhaften Cholecystitis durch Ansetzen der Egel an die Schläfen. Johan Lebrecht Schmucker, Königlicher Preußischer Erster Generalchirurg, empfiehlt in "Vermischte chirurgische Schriften" (1776) die Therapie mit Blutegeln bei hartnäckigen Augenentzündungen, heftigen Kopfschmerzen, Gichtbeschwerden, Dysphagie bei der "inflammatorischen Bräune", Pleuritis, Hämoptoe, Amenorrhoe, Harnverhaltung /19/.

Die stärkste Verbreitung der Blutegelanwendung in der Medizin fand im 19. Jh. statt, zunächst in England und Frankreich, später auch in Deutschland. So wurden beispielweise 1827 in Frankreich 33 Millionen und im Jahre 1850 100 Millionen Blutegel verbraucht. Durch diese immense Nachfrage gingen die Bestände der in den Gewässern lebenden Tiere erheblich zurück, es mußten Blutegelzuchtanstalten eingerichtet werden. Zu dieser Zeit gewann die sogenannte physiologische Medizin an Bedeutung. Ihr Hauptvertreter Francois-Joseph-Victor Broussais und sein Schüler Jean Baptiste Bouillaud sahen die Ursache der meisten Krankheiten (u.a. Scharlach, Masern, Pocken, Geisteskrankheiten, Drüsenfunktionsanomalien) in einer übermäßigen Reizung des Magen-Darm-Kanals, des Endocard und der Intima der Gefäßwände, die zu Blutanhäufungen sowie Entzündungen führe. Die propagierte Behandlungsform bestand aus lokalen Blutentziehungen, Kälteanwendungen und in der Gabe säuerlicher, schleimiger Mittel.

Allein in der Abteilung von Broussais wurden im Jahre 1819 100 000 Blutegel verbraucht, Zahlen die von Bouillaud übertroffen wurden; seine Therapie erhielt die Bezeichnung Vampyrismus /19,86/.

Mit Einführung der Asepsis, einer besseren Kenntnis über Infektionserreger und Komponenten des Blutes flachte um die Jahrhundertwende das Interesse an der aktiven Behandlung mit Blutegeln immer mehr ab. Die Methode wurde nur noch von wenigen Ärzten angewandt und vornehmlich in die Praxen der Bader und Kurpfuscher verdrängt /19/. Seit ungefähr dem Jahre 1922 unterliegt die Blutegelhaltung nicht mehr offiziellen Bestimmungen /279/.

Weitere Ausführungen hierzu enthält Kapitel 2.1.5.2.

1.2 Vorkommen und Biologie des Blutegels

Der medizinische Blutegel, Hirudo medizinalis, war früher in ganz Europa, Nordafrika und dem südwestlichen Afrika verbreitet. Heute ist er noch in Ungarn und Jugoslawien in flachen, kalkarmen, stehenden Gewässern mit schlammigem und moorigem Grund zu finden. Zu medizinischen Verwendungen kommen Egel aus den Blutegelzüchtereien in Ungarn, Jugoslawien, Nordafrika, Kleinasien und der Bretagne /78/.

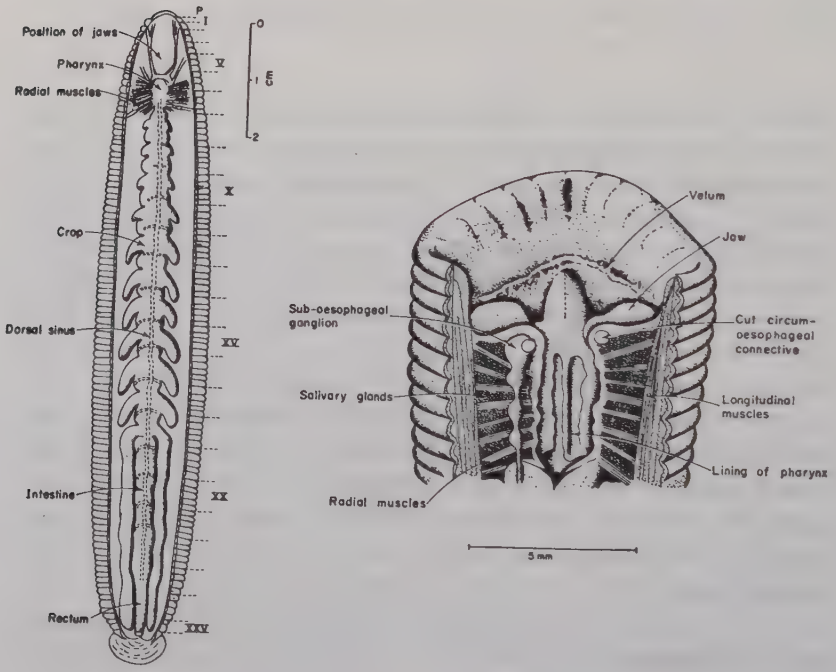
Es wird angenommen, daß Egel ca. 27 Jahre alt werden. Sie sind frühestens im Alter von 3 Jahren verwendungsfähig und im Alter von 9 Jahren geschlechtsreif. Diese zwittrigen Tiere scheiden zur Bildung des Kokons eine weiße, zähe, sehr widerstandsfähige eiweißreiche Substanz aus. Ein Kokon enthält ca. 7-14 Eier, die Embryonalentwicklung dauert 4-5 Wochen /280/.

Der blutsaugende Egel sezerniert einen blutgerinnungshemmen-

den Wirkstoff, der für die Tiere von vitaler Bedeutung ist. Diese Substanz nannte Jacoby im Jahre 1904 "Herudin", später "Hirudin" /99/.

Hirudin wird in den einzelligen Peripharyngealdrüsen gebildet. Diese Speicheldrüsen sind in den Segmenten VII,VIII und IX lokalisiert und liegen zwischen radiär angeordneten, zur Körperwand ziehenden Pharynxmuskeln. Die Ausführungsgänge der Drüsen vereinigen sich zu kleinen Bündeln, die cranialwärts in den Kiefern münden, siehe Abbildung 1 /155,143/.

Abb. 1: Hirudo medizinalis (K.H. Mann /143/)
a) Längsschnitt durch den ganzen Egelkörper
b) Längsschnitt durch das Vorderende des Blutegels (Ventralansicht)



Das aus der Wunde nach einem Egelbiß fließende Blut gerinnt nicht infolge des gleich mit Beginn des Saugens aus den Peripharyngealdrüsen abgesonderten Hirudin. Zum Saugen heftet sich das Tier zunächst mit seinem hinteren Saugnapf am Wirtsorganismus fest, drückt anschließend seinen Kopf senkrecht von oben gegen die Haut, stülpt einen Teil der Mundhöhle nach außen, in dem sich eine runde anhaftende Scheibe bildet. Nach dem Vorschieben der Kiefer durch die erweiterten Spalten der Mundhöhle wird die Haut durchschnitten. Während des Saugens nimmt der Egel eine walzenförmige Gestalt an /143,19/.

Das ungerinnbare Blut gelangt in den Intestinaltrakt des Egels durch einen Pumpmechanismus des Pharynx. Im Ruhezustand werfen die Wände des Pharynx tiefe Falten, die bei der Nahrungsaufnahme durch die Tätigkeit der radiären Pharynxmuskulatur verschwinden; die Wand ist dann faltenlos und dilatiert /143/.

Im allgemeinen ernähren sich die Blutegel unregelmäßig, sind jedoch in der Lage, große Mengen Blut - das 2-5fache ihres Körpergewichtes - aufzunehmen. Das Blut hält sich unverändert über längere Zeit im Mitteldarm des Tieres und wird über mehrere Monate langsam verdaut /19,143,158/.

Die Ungerinnbarkeit des aufgenommenen Blutes ist außer zum Nahrungserwerb auch eine Voraussetzung für die Fortbewegung des Egels. Hierzu ändert das Tier seine Körperform; diese Beweglichkeit wäre bei Koagulation des Blutes im Egeldarm nicht möglich /143/.

Die Plasmin-Trypsin-Akrosin-Inhibitoren, genannt Bdelline, sind nach Untersuchungen von R. Marx im ganzen Egelkörper, jedoch mit einer höheren Konzentration im Bereich der äußeren Geschlechtsorgane zu finden /57/. Aufgrund der inhibitorischen Aktivität der Bdelline gegen Akrosin, ein wichtiges Enzym im Befruchtungsvorgang, wird ein Zusammenhang dieser Hemmstoffe mit der Zwitternatur der Egel vermutet /227/.

Die physiologische Funktion der Egline im Egelkörper ist noch unbekannt. Diese Inhibitoren des Chymotrypsins, Subtilisins und der Granulozytenproteasen Elastase und Kathepsin G wurden aus Rohhirudinextrakten isoliert /227/.

1.3 Physiologie der Blutgerinnung

Mit Berücksichtigung der Prädominanz des Antikoagulans Hirudin unter den Inhibitoren aus dem Hirudo medizinalis werden die Reaktionsabläufe in der Gerinnungskaskade und ihre Beeinflussung durch Hirudin, einem spezifischen Antithrombin, schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

Die endogene (intrinsic) Gerinnungskaskade beginnt mit der Aktivierung des Faktor XII (Hagemann Faktor) durch Kontakt mit Kollagen aus der geschädigten Gefäßwand; durch einen solchen Kontakt wird auch die Freisetzung des ADP aus den Blutplättchen und somit die Thrombozytenagglutination stimuliert. Der aktive Faktor XII, Faktor XIIa, induziert außer der Umwandlung von Faktor XI (Plasma-Thromboplastin Antecedent) in Faktor XIa auch die Aktivierung von Prokallikrein sowie des Komplementsystems und bewirkt dadurch auch die Freisetzung des Bradykinins aus dem Kininogen /28/.

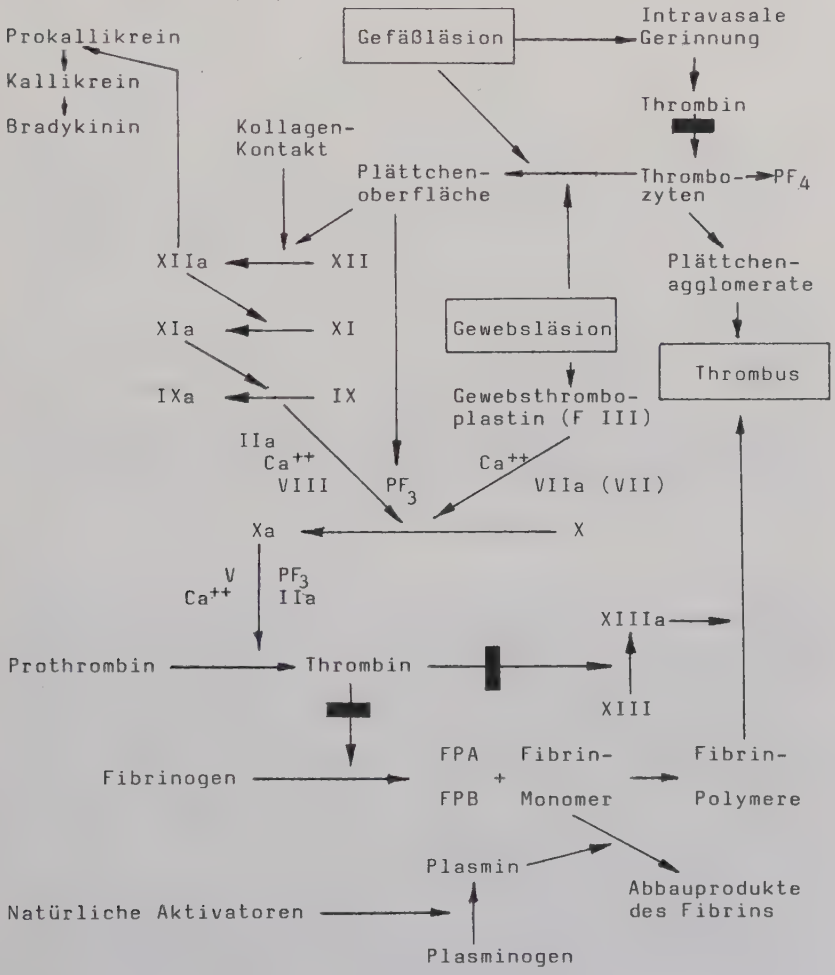
Im sog. exogenen bzw. extrinsic System löst die Freisetzung des Gewebsthromboplastins bei Gewebsläsionen in Gegenwart von Ca^{++} und Faktor VII (Prokonvertin) die Aktivierung des Faktor X (Stuart-Prower-Faktor) aus. Die nachfolgenden Reaktionsabläufe sind für beide Systeme identisch /109,28/.

Die weiteren Aktivierungsvorgänge bei der Gerinnung sind aus dem nachstehenden Schema (Abbildung 2) zu entnehmen.

Beim physiologischen Gerinnungsvorgang laufen die einzelnen Reaktionen praktisch gleichzeitig ab. Thrombin ist an ver-

schiedenen Aktivierungsreaktionen beteiligt und kann zugleich seine eigene Bildung beschleunigen /151,155/, (siehe hierzu Kap. 2.1.3.1.4). Im humanen System werden durch Hirudin ausschließlich die Thrombin-katalysierten Reaktionen gehemmt.

Abb. 2: Darstellung der Gerinnungskaskade nach Coe und Salzman /28/:



Unterbrechungen durch Hirudin
PF 3/4 Plättchenfaktor 3 bzw. 4
FPA,B Fibrinopeptide A und B

1.4 Protein-Inhibitoren der Serinproteasen

Die aus dem medizinischen Blutegel isolierten Wirksubstanzen Hirudin sowie die Bdelline und Egline sind relativ niedermolekulare Protein-Inhibitoren, deren Hemmaktivität gegen Serinproteasen (siehe Tabelle 1) gerichtet ist.

Tab. 1: Zusammenstellung der Proteinase-Inhibitoren des medizinischen Blutegels nach Fritz et al. /47/

Inhibitor	MG	Hemmwirkung gegen					
		Trypsin a	Plasmin b	Akrosin c	Thrombin d	Chymotrypsin a	Elastase Kathepsin G e
Hirudin	7000	-	-	-	++	-	-
Bdellin A	6000	++	++	+	-	-	-
Bdellin B	4000	++	+	++	-	-	-
Eglin	8100	(+)	-	-	-	++	++

++ sehr starke, + starke, (+) schwache,- keine Hemmaktivität
a Rind; b Schwein, Mensch; c Eber, Mensch; d Rind, Mensch;
e Granulozytenproteasen vom Mensch

Inhibitoren kommen ubiquitär vor. Sie hemmen viele biochemische Reaktionen. Im Organismus regulieren sie physiologische Reaktionsabläufe wie beispielsweise die Blutgerinnung und Stoffwechselvorgänge. In der Therapie finden einige Hemmstoffe Anwendung, auch stellen sie geeignete Hilfsmittel zum Studium biologischer Vorgänge dar. Die Enzym-Inhibitor-Interaktionen tragen zum Verständnis der Spezifität der Proteinasen bei /17,127,243/.

Die Protein-Inhibitoren sind gegen denaturierende Einflüsse im allgemeinen relativ unempfindlich. Sie reagieren mit einer oder mehreren Proteinasen und bilden in einer stöchio-

metrischen, meist reversiblen Reaktion einen inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplex. Alle enzymatischen Funktionen der Proteinasen sind im Komplex blockiert. Die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung während der Interaktion von Enzym und Inhibitor ist von der Inkubationstemperatur praktisch unabhängig. Aus diesem Grund kann durch Vorinkubation bei verschiedenen Temperaturen die inhibitorische Wirkung eines Hemmstoffes von enzymatischen Abbauvorgängen unterschieden werden. Enzym-Inhibitor-Komplexe sind sehr stabil und weisen meist nur eine sehr geringe Dissoziation auf /129,127,60/.

Die Hemmstoffmenge wird in Inhibitor-Einheiten angegeben. 1 Inhibitoreinheit (IU) ist die Inhibitormenge, die 1 Enzymeinheit (U) vollständig hemmt, d.h. 1 IU reduziert die Enzym-katalysierte Spaltung eines Substrates um 1 µmol/min unter definierten Bedingungen /60/.

Die Serinproteasen katalysieren den enzymatischen Abbau der Proteine (Substrate) durch hydrolytische Spaltung bestimmter Peptidbindungen im Substratmolekül. Die Enzyme besitzen eine hohe Affinität zu Strukturbereichen bzw. einer bestimmten Peptidsequenz oder einem bestimmten Aminosäurerest der reaktiven Peptidbindung des Substrates bzw.Inhibitors /109,128/.

Ein wichtiger Funktionsbereich im aktiven Zentrum der Serinproteasen ist das sog. "charge relay system", ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren Serin 195, Histidin 57 und Asparagin 102. Durch das Zusammenwirken dieser Aminosäuren gewinnt der Serinrest 195 seine hohe Reaktivität und die entscheidende Rolle bei den Katalysevorgängen /81,17,116,234/.

In Analogie zum aktiven Zentrum der Enzyme besitzen die Proteaseinhibitoren ein sog. "reaktives Zentrum". Die Inkubation des nativen Inhibitors mit katalytischen Mengen des Enzyms kann unter bestimmten Bedingungen (zumeist saures Puffermilieu vom pH 4,0-2,5) zur Hydrolyse der Peptidbindung

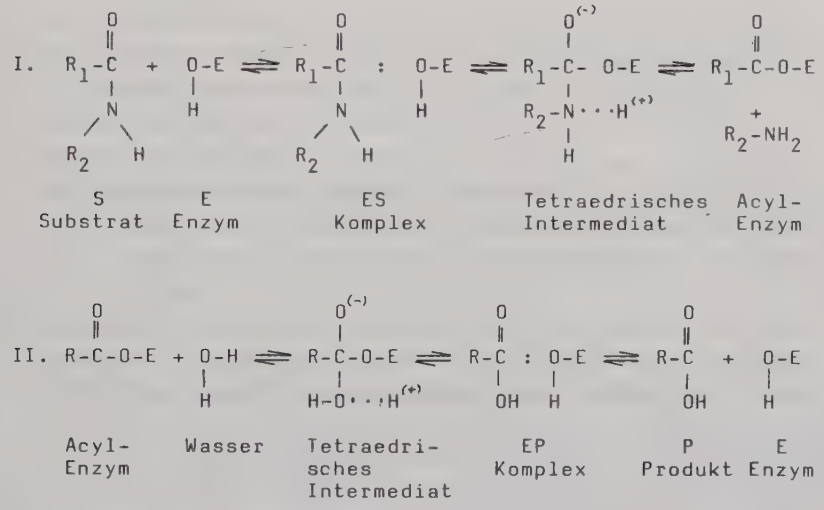
im reaktiven Zentrum des Inhibitormoleküls führen /128/. Aus dem nativen Hemmstoff entsteht so durch limitierte Proteolyse einer einzigen Peptidbindung ein modifizierter Inhibitor. Sowohl der native als auch der modifizierte Inhibitor sind aktiv, letzterer reagiert jedoch wesentlich langsamer als der native Inhibitor mit dem Zielenzym. Der in beiden Fällen entstehende identische Enzym-Inhibitor-Komplex ist sehr stabil /128,32/.

Für die enzymkatalysierte Spaltung einer Peptidbindung ist in erster Linie die möglichst ungehinderte Interaktion zwischen dem Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe des Serinrestes 195 mit der Carboxamidgruppe der affinen Peptidbindung von Bedeutung. Seitenketteninteraktionen spielen bei der Determinierung der Spezifität der Enzym-Substrat-Wechselwirkung eine entscheidende Rolle. Bekannte Beispiele für die dadurch erzielbare Selektivität sind Trypsin und Thrombin, die nur Peptidbindungen spalten können, deren Carboxylgruppe den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin gehört. Entscheidend dafür ist, daß die basische Seitenkette dieser Aminosäuren in der Spezifitätstasche des Enzyms fixiert werden kann, was durch die am Boden der Tasche befindliche saure Aminosäure Asp 189 begünstigt wird. Beim Thrombin ist die Spaltspezifität durch Seitenketteninteraktionen in der Umgebung der Spezifitätstasche des Enzyms noch weiter eingeschränkt, so daß von vielen in der Natur vorkommenden Lys- bzw. Arg-Bindungen nur sehr wenige gespalten werden, beispielsweise im Fibrinogenmolekül (1g ca. 350 000) nur zwei /17,30,116, 234,60/.

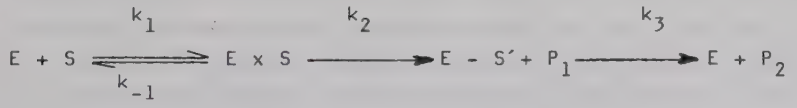
Die Interaktion zwischen Enzym (E) und Substrat (S), in Abbildung 3 schematisch dargestellt, und die Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor sind, mechanistisch gesehen, weitgehend analog. Zunächst bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex (ES), der in ein tetraedrisches Zwischenprodukt (Intermediat) übergeht /116/. Dieses tetraedrische Zwischenprodukt wird durch Substrathydrolyse in ein Acyl-Enzym-Zwischenprodukt (E-S') und in eine "leaving group" (P_1)

gespalten. Im nachfolgenden Deacylierungsschritt des Acyl-Enzym-Intermediates findet der umgekehrte Mechanismus zur Acylierung statt. Die Reaktionsprodukte sind ein Spaltpeptid des Substrates (P_2) und das freie Enzym (E), das mit einem weiteren Substratmolekül reagieren kann /30,157,139/.

Abb. 3: Mechanismus der Substrat-(Peptid)hydrolyse durch Serinproteasen nach Davie /30/



Die Kinetik der einzelnen Reaktionsschritte wird durch die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten k beschrieben /157/:



2. Die Wirkstoffe von Hirudo medizinalis

2.1 H i r u d i n

2.1.1 Isolierung und Reingewinnung

Die Vielfalt der im Laufe der Jahre entwickelten Methoden zur Reindarstellung des Hirudins wird in diesem Kapitel in chronologischer Reihenfolge zusammengefaßt.

1884 wies Haycraft /85/ die blutgerinnungshemmende Wirkung eines vom medizinischen Blutegel sezernierten Sekretes nach. Die Beobachtungen, daß die Blutung nach einem Blutegelbiß nur verzögert sistierte und das gesogene Blut weder im Verdauungsstrakt noch nach Herausnahme aus dem Darm des getöteten Egels gerann, veranlaßte Haycraft nach einem vom Egel abgesonderten Antagonisten des Blutgerinnungsfermentes zu suchen.

Zunächst wurden fein zerschnittene, mit 6%iger Kochsalzlösung vermischte Mund-, Schlund- und Darmteile auf ihre Wirksamkeit gegenüber Schafsblut untersucht. Es stellte sich heraus, daß die wirksame Substanz im Kopfteil des Tieres gebildet wurde.

Bei den ersten Isolierungsversuchen des "aktiven Prinzips" verwendete Haycraft wäßrige Extrakte aus zerriebenen Vorderteilen, die zur Beseitigung von Verunreinigungen einige Tage zuvor in absolutem Alkohol gelegen hatten. 20 ccm dieses Extraktes (8 Blutegeln äquivalent) wurden einem 5 kg schweren Hund in die Vena jugularis injiziert und 1 ccm Blut nach 3, 18 und 38 min aus der Arteria carotis entnommen. Die 3 Blutproben blieben über 12 Stunden flüssig /85/.

Haycrafts Ergebnisse motivierten in der Folgezeit verschiedene Arbeitsgruppen, diese Substanz näher zu determinieren. **Schultze** (1891) /224/ und **Blobel** (1892) /16/ stellten für

ihre Untersuchungen über die praktische Verwendbarkeit der gerinnungshemmenden Komponente des Hirudo medizinalis bei Transfusionen die Egelauszüge nach zwei Methoden her:

1) Bereitung eines "Extractum hirudinum frigide paratum" /224/
   - Egelvorderteile wurden 3-10 Tage in absolutem Alkohol gehalten, anschließend zerkleinert, im Luftbade zwischen 45° und 50° C getrocknet und nach einer 12-stündigen Behandlung mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung filtriert.

   10 ccm dieses Extraktes waren notwendig, um 50 ccm Blut ungerinnbar zu halten. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades folgte die

2) Bereitung eines "Decoctum hirudinum"
   - nach der oben (1) erwähnten Vorbehandlung wurden die gehärteten, in einer Pfeffermühle gemahlenen Gewebestücke 10 min mit 0,6%iger Kochsalzlösung abgekocht und filtriert.

   Dieses Decoct war im Vergleich zum kalt hergestellten Auszug keimarm, jedoch weniger wirksam und hatte nach 1- bis 2-wöchiger Aufbewahrung seine Aktivität fast vollständig verloren. Die Resultate entsprachen somit nicht den Erwartungen.

Jacobj /99/, auf der Suche nach einer geeigneten gebrauchsfertigen gerinnungshemmenden Substanz für seine Durchblutungsversuche an Organen, bewog Franz (1903) /46/, die Möglichkeiten zur Gewinnung eines stabilen und dosierbaren reinen Präparates aus Blutegelextrakten zu eruieren. Bei dem Versuch, einen wirksameren Stoff aus präparierten, die sezernierenden Drüsen enthaltenden Muskelschlundringen zu gewinnen, stellte sich heraus, daß die Auszüge aus ganzen Egelköpfen die gleiche Aktivität jedoch mehr verunreinigendes Ausgangsmaterial enthielten. Zur Verarbeitung größerer

Mengen verwendete Franz nicht Schlundringpräparate, sondern stellte die Extrakte mit einer weniger aufwendigen Methode, dem Fällungsverfahren aus ganzen Köpfen, her. Die mit Sand zerriebenen Blutegelköpfe wurden zur Verhinderung von Fäulnis- und Zersetzungserscheinungen mit thymolisierter physiologischer Kochsalzlösung versetzt und anschließend im Wasserbad bei 38° C extrahiert und zentrifugiert. Die Reinigung dieser Extrakte bestand in einer 2-stündigen Erwärmung auf 60° C und einem 3-tägigen Einwirken von Chloroformdämpfen mit Abzentrifugieren der Niederschläge und Entfernung der beigemengten Salze mittels Dialyse. Die so erhaltene Lösung wurde im Vakuum über Schwefelsäure eingetrocknet /46/.

Auf diese Weise war es Franz geglückt, ein mindestens 12 Monate haltbares Trockenpräparat herzustellen. Die Ausbeute pro Egelkopf betrug 8 mg Trockensubstanz, die (in 2 ccm Aqua dest. gelöst) keinen Aktivitätsverlust gegenüber dem Ausgangsextrakt aufwies. Fortan wurden die Präparate als vollwertig bezeichnet, wenn 0,8 mg dieses Stoffes 10 ccm Kaninchenblut 2 x 24 h ungerinnbar hielten. Diese Wirksubstanz nannte Jacobj "Herudin" /99/. Weiterhin stellte Franz im Laufe seiner Untersuchungen fest, daß die Wirksamkeit der Extrakte vom Ernährungszustand der Blutegel abhängt und eine bessere Ausbeute erreicht wurde, wenn die Tiere mindestens 14 Tage gehungert hatten /46/.

1904 erzielte Bodong /18,99/ durch mehrmalige, jeweils 24-stündige Extraktion mit Kochsalzlösung von ebenfalls mit Sand zerkleinerten Blutegelköpfen eine bis zu 50% höhere Ausbeute als Franz. Weiterhin wurden die Lösungen im Kochsalzbad zur Fällung von Eiweißkörpern kurzfristig auf 100° C bei schwach saurer Reaktion erhitzt und eventuell noch vorhandenes Mucin in der Kälte nachgefällt. Pigmentreste wurden durch aufgeschwemmten Talk adsorbiert und mit diesem abfiltriert, die Salze mittels einer kürzeren Dialyse mit thymolisiertem Aqua dest. entfernt. Bei längeren Dialysezeiten passierte das Hirudin die Membran und der Auszug verlor an Wirksamkeit. 7,8 mg (ein Egelkopf) des gewonnenen Präparates

hielten ca. 240 ccm Blut, gegenüber 50 ccm in der Vorarbeit (Franz 1903), 2 x 24 h ungeronnen /18/.

Weitere Versuche zeigten, daß weder chemische noch andere zur Blutstillung angewandte Stoffe wieder eine Koagulation des Hirudinblutes herbeiführen konnten /99/.

Waldschmidt-Leitz et al. /264/ stellten 1929 Vergleiche zwischen den Rohauszügen an, die mit verschiedenen wäßrigen Extraktionsmitteln oder mit 87%igem Glyzerin gewonnen wurden. Ihre Resultate ergaben eine höhere Ausbeute und Konzentration des Hirudins bei Glyzerinanwendung. Aus diesem Grunde führten sie ihre Versuche zur Isolierung des Hemmstoffes ausschließlich mit Glycerinauszügen aus Blutegelköpfen durch. Ihr Reinigungsverfahren bestand in der wiederholten Abtrennung unwirksamer Begleitstoffe mittels Kaolin sowie in der Adsorption des Hirudins an Tonerde. Nach Elution des Adsorbates mit alkalischen Lösungen wurden deren Inhaltsstoffe durch Fällung mit Alkohol und Äther in eine trockene Form gebracht. Der Reinheitsgrad des Präparates entsprach einem Hirudinwert von 950 H-(w). Mit dem Hirudinwert wurde die Anzahl der Hirudin-Einheiten pro g Präparat wiedergegeben und als Hirudineinheit H-(e) die Menge definiert, die die Gerinnung von 4 ccm Ziegenblut mit normaler Gerinnungszeit um 25 min verzögerte /264/.

Yanagisawa und Yokoi /276/ isolierten 1938 aus ganzen Blutegeln ein Präparat mit einem Molekulargewicht von 835 und folgender Aktivität: 1 ccm Blut vermischt mit 1 ccm Salzlösung und 0,01 mg der gewonnenen Substanz zeigte keine Gerinnung in 24 h. Wirkstoffe mit einem auch nur annähernd so niedrigen Molekulargewicht wurden von anderen Arbeitsgruppen nicht beschrieben. Da die verwendete Blutegelgattung von den Autoren nicht angegeben wurde, wird vermutet, daß es sich um eine im europäischen Raum unbekannte japanische Egelart handelte /148/.

1955 gelang es Markwardt /148/, ein chemisch einheitliches

Hirudin zu isolieren und gleichzeitig die chemische Natur dieses rein dargestellten Inhibitors aufzuklären. Die im folgenden beschriebenen Ergebnisse von Markwardt et al. berechtigten zu der Annahme, daß selbst die reinsten bis dahin bekannten Präparate erhebliche Mengen unwirksamer Bestandteile enthielten.

Die schon seit langem vermutete Eiweißnatur dieser Wirksubstanz konnte Markwardt durch die Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung (siehe Kapitel 2.1.2.2) beweisen. Wegen der Gefahr einer Denaturierung dieses Proteins wurden, um eine optimale Ausbeute zu gewährleisten, sehr schonende Isolierungsverfahren angewandt.

Mittels der in Abbildung 4 beschriebenen Isolierungsprozedur stellte Markwardt eine elektrophoretisch und chromatographisch homogene Substanz her. Das Prinzip dieses Verfahrens bestand zunächst in einer behutsamen Vorreinigung zur Entfernung des Hauptanteils an unwirksamen Ballaststoffen und in den darauffolgenden entscheidenden Reinigungsschritten durch elektrophoretische und chromatographische Trennverfahren /144,148,155/.

Als Ausgangsmaterial wurden 1,5 g schwere Blutegel der Arten Sanguisuga medicinalis und officinalis benutzt. Die Tiere hatten in den letzten 3 Monaten weder gesogen noch befanden sie sich im Stadium der Eikapselbildung /148/.

Zur Extraktherstellung wurden die Egel 24 h in 96%igem Äthanol bis zur Härtung aufbewahrt und danach die Vorderenden (ca. 5 mm vor der vorderen, männlichen Geschlechtsöffnung) abgetrennt. Nach 24-stündigem Entwässern und Härten in absolutem Alkohol wurden die 10-15 mm langen Kopfstücke homogenisiert und getrocknet. Die spezifische Aktivität dieses Pulvers betrug 13 AT-E/mg. (Ausführliche Erläuterungen zur Aktivität enthält Kap. 2.1.2). Die weitere Aufbereitung dieses Extraktes wird aus Gründen einer besseren Übersicht in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Abb. 4: Isolierung von Hirudin nach Markwardt (1955) /148/

Pulverisierter Hirudinauszug — Spez. Akt. 13 AT-E/mg

Rückstände (Ballast) abzentrifugiert

- Fraktionierte Fällung mit 40%igem Aceton bei 40° C
- Zusatz von Essigsäure, pH 5,0 und 10%iger Trichloressigsäurelösung in Aceton, pH 1,8
- Ausflockung durch eiskaltes Aceton; nach Absetzen in der Kälte, zentrifugieren

Aktive Fraktion

- mit Aceton und Äther gewaschen und getrocknet

Roh-Hirudin — Spez. Akt. 700 AT-E/mg

Fällung in Dialysezelle, Ballast abzentrifugiert

- Dialyse einer 1%igen wäßrigen Lösung des Rohpräparates im Elektrodialysator gegen Aqua dest.

Klare Lösung

- Ausflockung mit Aceton
- mit Aceton und Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet

Hirudinhaltige Fraktion — Spez. Akt. 1 200 AT-E/mg

Rückstand abzentrifugiert

- Extraktion durch fraktionierte Fällung mit 55%igem n-Propanol

Extrakte (gefriergetrocknet) — Spez. Akt. 2 500 AT-E/mg

<u>Präparative Papierelektrophorese</u>

- Puffersalze durch Sublimation entfernt
- aktive Fraktion mit Wasser eluiert, gefriergetrocknet
- mit absolutem Äthanol ausgefällt
- Niederschlag mit Alkohol und Äther gewaschen, im Vakuum getrocknet

Hirudin — Spez. Akt. 8 500 AT-E/mg

1 Gamma Trockensubstanz inaktivierte 8,5 +/- 0,2 NIH-E Thrombin

Aus dem Resultat der einzelnen Isolierungsschritte ist ersichtlicht, daß bereits die Wirksamkeit des Roh-Hirudins von 700 AT-E/mg die Aktivität der bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Hirudin-Handelspräparate übertraf /148/.

Bei der Prüfung des Reinheitsgrades zeigte sich eine elektrophoretisch und chromatographisch nicht zerlegbare Substanz /148/.

Mit Kenntnis der spezifischen Antithrombinwirkung des Hirudins gewann dieser Inhibitor zunehmend an Bedeutung. Verschiedene Arbeitskreise waren bemüht, Methoden zur Gewinnung eines homogenen Hirudins bei geringem Wirkstoffverlust zu entwickeln.

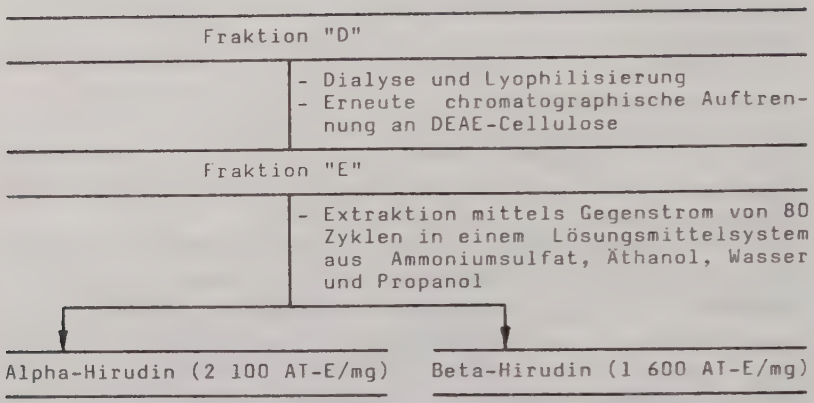
Jutisz, Charbonnel-Berault und Martinoli (1962) /104/ verwendeten zur Herstellung der Auszüge ebenso Blutegelköpfe. Diese wurden zwischen dem 8. und 10. Segment abgetrennt, in Aceton bei -15° C zermalmt, abfiltriert und mit Aceton gewaschen und getrocknet. Dieses "Aceton-Pulver" war das Ausgangsmaterial für den weiteren in Abbildung 5 schematisch dargestellten Reinigungsvorgang.

Die beiden aktiven Formen des Hirudins zeigten unterschiedliche Löslichkeit im Lösungsmittelsystem des Gegenstromverfahrens. In der Papierelektrophorese besaßen sie jedoch die gleiche Mobilität. Unklar blieb, ob beide aktive Formen natürlicherweise vorkommen oder erst im Laufe der Reingewinnung gebildet worden sind /104/.

Die papierelektrophoretische Auftrennung ergab bei der Prüfung des Reinheitsgrades ein fast homogenes Alpha- und Beta-Hirudin mit nur geringsten Verunreinigungen /104/.

Abb. 5: Isolierung des Hirudins nach Jutisz et al. /104/

Aceton-Pulver	
Zerstörung der Lipoprotein-verbindungen	Behandlung mit Butanollösung bei -15 °C, Rückstand abzentrifugiert; wiederholt mit absolutem Alkohol und Schwefeläther gewaschen und getrocknet
Butanol-Pulver	
Rückstand abzentrifugiert	Fraktionierte Extraktion bei 4 °C mit 0,3%igem NaCl
Überstehende Lösung "A"	
Rückstand	Zugabe von Essigsäure, pH 5,0 Fällung durch Zusatz von 95%igem, auf -15 °C gekühlten Alkohol bis zu einer Alkoholkonzentration von 40%
Überstehende Lösung "B 40" (- 15 °C)	
Überstehende Lösung "B 40 Zn"	Zugabe von Zinkacetatlösung 0,1 M und Zentrifugieren des Präzipitates
Fraktion "B 40 Zn"	
Rückstand abzentrifugiert	Extraktion mittels Essigsäure-Natriumacetatpuffer 0,2 M, pH 5,0
Überstehende Lösungen "Extrakt pH 5"	
Eliminierung der Zn^{++} sowie verunreinigender Proteine und überstehenden Lösung	Behandlung mit Amberlite IRC-50 in Suspension, pH 5,0, Filtrieren und Waschen des Harzes mit Essigsäure-Natriumacetat-Puffer 0,2 M, pH 5,0 Ausfällen des Hirudins mit 80%igem Alkohol bei -15 °C
Hirudinhaltige Fraktion "C"	
Rückstand abzentrifugiert	gelöst und dialysiert gegen 0,008 N Tris-HCl Puffer, pH 7,3
Überstehende Lösung	
	Chromatographie an DEAE-Cellulose Elution gegen einen Ionen-Gradienten Fällung der aktiven Fraktion mit 80%igem Alkohol bei -15 °C



Die Autoren stellten im Widerspruch zu den Ergebnissen von Markwardt /148/ fest, daß das Protein mit zunehmendem Reinheitsgrad instabiler wurde. So wies das Alpha-Hirudin nach 9 Monaten auch bei einer Konservierungstemperatur von -15° C nur noch etwa die Hälfte seiner Anfangsaktivität auf. Die geringere Wirksamkeit des Alpha-Hirudins, im Vergleich zu der spezifischen Aktivität des von Markwardt isolierten Hirudins, wurde auf eine gewisse Denaturierung während des Reinigungsprozesses zurückgeführt, die offenbar ohne Veränderung der chemischen Zusammensetzung des Inhibitors einherging. Die Autoren wiesen in ihrer Publikation /104/ auf eine nicht näher beschriebene Modifikation des o.g. Isolierungsverfahrens hin, mit welchem sie ein chemisch analoges Alpha-Hirudin mit einer Aktivität von 8 800 AT-E/mg erhielten. Für eine rationelle Gewinnung größerer Mengen hochgereinigten Hirudins waren diese Methoden wegen des beachtlichen Wirkstoffverlustes ungeeignet /163/.

1966 wiesen Fritz et al. /57/ in verschiedenen Hirudin-Handelspräparaten außer einer spezifischen Antithrombinaktivität zusätzliche inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin und Plasmin nach, die auf eine "Verunreinigung" dieser Präparate mit anderen Proteinaseinhibitoren hindeuteten. Zunächst isolierten Fritz et al. /57/ Hemmstoffe gegen Trypsin und Plasmin, genannt Bdelline und 1977 Seemüller et al. /230/ die Egline, die eine Inhibitorwirkung gegen Chymotrypsin, Subtilisin sowie die menschlichen neutralen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G aufweisen. Diese Hemmstoffe werden ausführlich in den Kapiteln 2.3 und 2.4 beschrieben.

Auf der Suche nach einem geeigneten Vorgehen zur Hirudin-Reingewinnung, die den o.g. Forderungen Rechnung trug, modifizierten Markwardt et al. (1966) das ursprüngliche Reinigungsverfahren in einigen Schritten /166,171,156/. Der Rohextrakt wurde wie oben erwähnt gewonnen und danach dem in Abbildung 6 dargestellten Prozeß unterworfen.

Die stärkere Schrumpfung von DEAE-Sephadex bei Erhöhung der Ionenstärke wurde als mögliche Erklärung für die größeren Substanzverluste infolge Einschlusses von Hirudinmolekülen in die Gelmatrix angegeben. Die Verwendung des weniger vernetzten DEAE-Sephadex A-50 brachte jedoch keine höhere Ausbeute /171/.

Die Homogenitätsprüfung des hochgereinigten Präparates (10 400 AT-E/mg) zeigte ein einheitliches Verhalten bei Messungen der Sedimentation (0,98 S) und Diffusion (10,8 F). Ebenso ergab die elektrophoretische Auftrennung auf Papier, Membranfolien oder in der trägerfreien Elektrophorese eine einheitliche Substanz /166/.

Abb. 6: Reingewinnung von Hirudin nach Markwardt et al. (1966) /166,171,156/

Roh-Hirudin — Spez. Akt. 500 AT-E/mg

Niederschlag (hochmolekulare Ballaststoffe) abzentrifugiert
- Fraktionierte Äthanolfällung
- Extraktauflösung in eiskaltem Aqua dest.
- wiederholte Behandlung mit 96%igem Äthanol bei 0-5° C

Überstehende hemmaktive Lösung
- Ausfällung nach Abkühlung auf 0° C und Zusatz von tiefgekühltem (-10° C) Äthanol bis zu einer Konzentration von 85 Vol.%, vollständige Ausflockung durch zugefügtes 0,5%iges Ammoniumacetat
- abzentrifugierter Niederschlag mit Äthanol gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet

Hirudinpräparat Spez. Akt. 1 300 - 1 500 AT-E/mg (10-15% reines Hirudin, ansonsten inaktives Material sowie geringe Mengen eines Trypsin-Inhibitors)

Adsorption der Pigmente an Oxycellulose /166/
- Adsorption an Kationenaustauscher, Behandlung mit Oxycellulose
- Hirudin in 0,01 M Ammoniumacetatpuffer, pH 4,6 gelöst
- zerkleinerte Oxycellulose eingerührt, abfiltriert, 3x mit Aqua dest. gewaschen
- Resthirudin aus Oxycellulose mit 0,05 M Ammoniumacetatpuffer, pH 4,6 eluiert.

Hirudinhaltige Lösung (Filtrat, Waschwasser und Eluat)
- Adsorption an Kationenaustauscher
- a) Wofatit CP oder H-Ionen-Form oder b) säulenchromatographische Auftrennung an Amberlite IRC-50 (äquilibriert mit 0,05% Ammoniumformiat, pH 4,9) oder c) CM-Sephadex C-50 (äquilibriert mit 0,05 M Pyridinacetat, pH 4,5)
- Abfiltrieren und Auswaschen des Harzes 3x mit Aqua dest.
- Elution des Hirudins bei a) mit 1 M Ammoniumacetatlsg. und 5%iger Ammoniaklsg., pH 8,0
- Abfiltrieren des Eluates und Einengung im Vakuum bei 20-30° C
- Elution bei b) mit 0,05 Ammoniumformiatpuffer und 1 M Ammoniumformiatlsg.,pH 7,0
- Elution bei c) durch einen linearen Gradienten mit Pyridinacetat 0,05 M, pH 4,5/ Pyridin 2 M; Lyophilisierung

- Hirudinpräzipitation mit tiefgekühltem 95%igem Äthanol (-10° C) und Ammoniumacetat
- Hirudinniederschlag abzentrifugiert, mit kaltem Aceton gewaschen, im Vakuumexsikkator getrocknet

Reines Hirudin (40-50%) — Spez. Akt. 4 500 AT-E/mg

Niedermolekulare Ballaststoffe:

Gelfiltration über Sephadex G-50 /166/
- in 0,1 M NaCl gelöstes Hirudin auf Sephadex G-50 Säule aufgetragen (äquilibriert mit 0,1 M NaCl)
- Elution mit 0,1 M NaCl, Eluat in Fraktionen aufgefangen, aktive Fraktionen vereinigt, im Vakuum eingeengt
- über Sephadex G-25 entsalzt; lyophilisiert

Hirudin (ca.15-20% Verunreinigungen enthalten) — Spez. Akt. 8 400 AT-E/mg

Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25
- chromatographische Auftrennung an DEAE-Sephadex A-25 Säule (äquilibriert mit 0,05 M Pyridinacetatlösung), pH 7,4
- Fraktionierung durch lineare Gradientenelution mit 0,05 M Pyridinacetatpuffer, pH 7,4 / 1 M NaCl in 0,5 M Pyridinacetatpuffer, pH 6,9
- aktive Fraktionen vereinigt, im Vakuum konzentriert, gegen Sephadex G-25 entsalzt; lyophilisiert

Hochgereinigtes Hirudin — Spez. Akt. 10 400 AT-E/mg

Die Isolierungsprozedur von Markwardt et al. ist in Tab. 2 hinsichtlich der erzielten Anreicherung an Hirudinaktivität pro Isolierungsschritt nochmals zusammenfassend dargestellt.

Tab. 2: Zusammenfassung der Hirudinisolierung nach Markwardt /166,171,156/

Methoden	Trockengewicht [mg]	Gesamtaktivität [AT-E]x10^{-3}	Spez. Akt. [AT-E/mg]	Verlust [%]
10 000 Blutegelköpfe in 96%igem Äthanol entwässert und zerkleinert	380 000	500	13	
Extraktion mit 40%igem Aceton, Ausfällung von Ballaststoffen	900	450	500	10
Fraktionierte Äthanolfällung	270	405	1 500	19
Adsorption der Pigmente an Oxycelluose				
Adsorption des Wirkstoffes an Kationenaustauscher, Elution, Lyophilisierung	80	360	4 500	28
Gelfiltration über Sephadex G-50	34	295	8 400	43
Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25	20	208	10 400	41

Die Arbeitsgruppe Baskova, Cherkesova und Mosolov (1976) /12,13/ führte eine vergleichende Studie über erzielbare Antithrombinaktivitäten bei der Hirudingewinnung aus ganzen Blutegeln, Egelkörpern oder Egelköpfen durch. Die Resultate sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tab. 3: Zusammenfassung der Resultate der Baskova / Cherkesova / Mosolov-Gruppe hinsichtlich der Ausbeuten an Hirudinaktivität bei der Isolierung des Inhibitors aus Blutegelköpfen, -körpern und ganzen Egeln /12/.

Reinigungsschritte	Spezifische Aktivität in [AT-E/mg] Protein	[AT-E/mg] Trockengewicht		
	Hirudin/ Egelköpfe		Hirudin/ ganze Egel	"Pseudo- * hirudin"/ Egelkörper
Extraktion und Acetonfällung	-	350	72	10
Äthanolfraktionierung	-	1 170	165	20
Chromatographie an Trypsin-Sepharose	-	1 570	200	21
Isoelektrische Fokussierung:				
Fraktionen I	4 750	2 200	700	48
II	8 230	4 250	1 200	52
III	2 150	910	-	-
Reinigung durch Komplexbildung mit Thrombin	15 600	-	-	-

* "Pseudohirudin, Protein mit geringster Antithrombinaktivität (ca. 1%), das bei der Hirudinisolierung aus ganzen Blutegeln vorkommt. Nähere Beschreibung in Kapitel 2.2

In Abbildung 7 wird der von Baskova et al. (1976) /12,13/ beschriebene Reinigungsvorgang aus Egelköpfen schematisch dargestellt. Unter Berücksichtigung der von Fritz et al. /57/ nachgewiesenen Beimengungen in Hirudinpräparaten mit Hemmwirkung gegen Trypsin und Plasmin wurde das Roh-Hirudin zur Eliminierung dieser Inhibitoren zusätzlich durch chromatographische Auftrennung an Trypsin-Sepharose gereinigt. Der Rohextrakt mit einer spezifischen Aktivität von 1170 AT-E/mg wurde bis einschließlich der fraktionierten Äthanolfällung wie von Markwardt /156/ vorgeschlagen hergestellt.

Bagdy et al. (1973) /4,5/ benutzten für die Hirudindarstellung ganze Blutegel, um die zeitaufwendige und mühsame Abtrennung der Blutegelvorderteile zu umgehen. Außerdem stellten sie fest, daß die Wirksubstanz bei einer Extraktion durch wäßrige Medien der Wirksubstanz aus bis dahin gebräuchlichen Auszügen mittels wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln äquivalent sei und viel weniger Pigmente enthielt.

Die zur Extraktherstellung verwendeten Tiere hatten 2-3 Wochen vorher keine Nahrung aufgenommen und wurden in dieser Zeit bei 4^{o} bis 10^{o} C gehalten. Das Hungern wurde als wichtige Voraussetzung für eine hohe Ausbeute an Roh-Hirudin angesehen. Die Egel wurden tiefgefroren bei -10^{o} C aufbewahrt, zur Bereitung des Auszuges nach dem Auftauen fein zerrieben und anschließend bei Raumtemperatur mit einer 0,5 M Kochsalzlösung extrahiert /5/. Der weitere Isolierungsvorgang wird in Abbildung 8 schematisch zusammengefaßt.

Zur Beurteilung des Reinheitsgrades des gewonnenen Wirkstoffes wurde eine Rechromatographie an Sephadex G-75 durchgeführt; diese zeigte eine einheitliche Substanz. Bei der Bestimmung der N-terminalen Aminosäure fand sich Valin in Übereinstimmung mit anderen Studien dieses Arbeitskreises.

Abb. 7: Isolierung des Hirudins aus Blutegelkopfextrakten nach Baskova et al. /12,13/

Hirudinextrakt — Spez. Akt. 1 170 AT-E/mg

Elution des Trypsin-Inhibitors "Bdellin" mit 0,2 M KCl, pH 2,0
- chromatographische Auftrennung an Trypsin-Sepharose des in 0,1 M Natriumbicarbonat (enthält 0,5 M NaCl), pH 8,0, gelösten Auszuges /278/
- Elution mittels alkalischer Lösung, pH 8
- Entsalzen und Lyophilisieren

Hirudinpräparat — Spez. Akt. 1 570 AT-E/mg

- Fraktionierung durch isoelektrische Fokussierung in einem Saccharose-Gradienten, pH 3-5
- Messung der optischen Dichte bei 280 nm und der Antithrombinaktivität der Fraktionen

* Fraktion I (Ip 3,8) — Spez. Akt. 4 750 AT-E/mg
Fraktion II (Ip 3,9) — Spez. Akt. 8 230 AT-E/mg
Fraktion III (Ip 4,0) — Spez. Akt. 2 150 AT-E/mg

**
- hirudinhaltige Fraktionen in 0,15 M Ammoniumbicarbonatpuffer, pH 8,0, gelöst
- Komplexbildung durch Zusatz einer Thrombinlösung (Aktivität 1 156 NIH-E/mg)
- Fraktionierung mittels Gelfiltration des Hirudin-Thrombin-Gemisches an Sephadex G-75 (äquilibriert mit 0,15 M Ammoniumbicarbonatpuffer, pH 8,0)

Fraktionen (enthalten Hirudin-Thrombin-Komplex)

Denaturiertes Thrombin abzentrifugiert
- Dissoziation des Komplexes durch Erhitzen 15 min im Wasserbad bei 80° C; Thrombin denaturiert und fällt aus

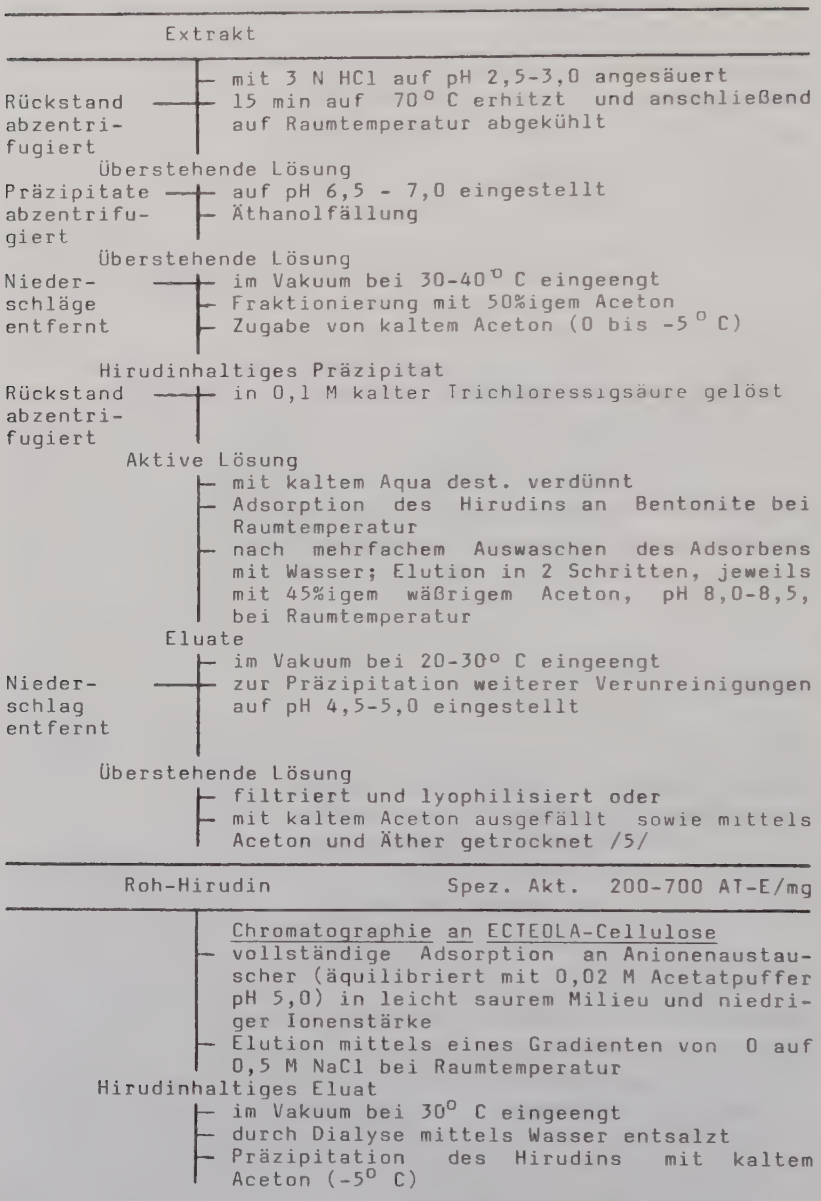
Hirudinhaltige Lösung
- Gelfiltration an Sephadex G-75 (äquilibriert mit 0,15 M Ammoniumbicarbonatpuffer, pH 8,0)
- Elution; Fraktionen mit Antithrombinaktivität vereinigt und lyophilisiert

Hochgereinigtes Hirudin — Spez. Akt. 15 602 AT-E/mg

* Aufgrund der ziemlich klaren Trennung der Fraktionen I und II wurde diskutiert, ob es sich um zwei Isoformen des Hirudins handelt, die sich in ihrer Antithrombinaktivität und im Ip unterscheiden. Die Antithrombinaktivität von Fraktion III wurde als Beimengung von Fraktion II angesehen. Die Aktivität der Fraktion II entsprach am ehesten der Wirksamkeit des durch andere Methoden isolierte Gesamthirudins /13/.

** Ein Thrombinüberschuß im Gemisch wurde durch Bildung eines Fibringerinnsels nach Hinzufügen einer 0,3%igen Fibrinogenlösung beurteilt /13/.

Abb. 8: Isolierung von Hirudin aus Extrakten von ganzen Blutegeln nach Bagdy et al. /4,5/



Partiell gereinigtes Hirudin Spez. Akt. 2 000 AT-E/mg

Gelbbraune Pigmente verbleiben in der Säule

Chromatographie an Sephadex CM C-25
- chromatographische Auftrennung an Sephadex CM C-25-Säule (äquilibriert mit 0,02 M Acetatpuffer, pH 5,0) der in 0,02 M Acetatpuffer, pH 5,0, hergestellten aktiven Lösung
- Gradientenelution von 0 bis 0,5 M NaCl bei Raumtemperatur
- Konzentrierung im Vakuum bei 30 ^{o} C und Entsalzung mittels Dialyse gegen Wasser
- mit kaltem Aceton (-5 ^{o} C) präzipitiert und getrocknet

Farblose aktive Fraktionen Spez. Akt. 5 800 AT-E/mg

Gelfiltration an Sephadex G-75
- Fraktionierung der in 0,1 M NaCl gelösten aktiven Substanz mittels Sephadex G-75 (äquilibriert mit 0,1 M NaCl)
- aktive Fraktionen im Vakuum konzentriert
- durch Dialyse gegen Wasser entsalzt; Lyophilisierung

Hirudin Spez. Akt. 6 800- 8 000 AT-E/mg /4/
8 000-10 000 AT-E/mg /5/

Die Autoren hielten diese Isolierungsprozedur, die in Tabelle 4 nochmal zusammengefaßt dargestellt wird, im Vergleich zu den anderen Methoden für die vorteilhaftere und für eine industrielle Herstellung der Präparate geeignet /5/.

Tab. 4: Zusammenfassung der Isolierung von Hirudin aus ganzen Blutegeln nach Bagdy et al. /5/

Methoden	Spezifische Aktivität [AT-E/mg]
Extraktion aus ganzen Blutegeln in wäßrigem Medium	
Äthanolfällung	
Fraktionierung mittels Aceton	
Adsorption an Bentonite	200 - 700
Chromatographische Auftrennung an ECTEOLA-Cellulose	2 000
Chromatographische Auftrennung an Sephadex-CM C-25	5 800
Gelfiltration an Sephadex G-75	8 000 - 10 000

2.1.2 Charakterisierung des Hirudins

Das Interesse am Antikoagulans Hirudin war groß, da es seine gerinnungshemmde Aktivität enfaltet, ohne die Zusammensetzung oder sonstige Beschaffenheit des Blutes zu verändern. Mehrere Arbeitsgruppen waren bemüht, neben seiner Gewinnung aus Blutegelauszügen gleichzeitig seine chemische Natur sowie den Angriffspunkt im Gerinnungssystem zu ermitteln.

Haycraft (1884) /85/ führte die antikoagulatorische Wirkung des aktiven Sekretes auf eine Zerstörung des Fibrinfermentes im Blut zurück und schloß aus seinen Versuchen, daß es sich bei der Substanz nicht um einen Eiweißkörper handelt.

Dickinson (1890) /32/ und ebenso einige Jahre später **Franz** /46/ ordneten jedoch das "aktive Prinzip" der Blutegelextrakte aufgrund von spezifischen Fällungs- und Farbreaktionen den Proteiden mit Eigenschaften der Proto- und Deuteroalbumosen zu.

Nach **Morawitz** (1904) /178/ wirkt das Hirudin auf den Fermentgenerator des Plasmas (von Morawitz "Thrombogenon" und von Fuld "Plasmozym" genannt) und nicht auf die Enzyme der Organextrakte ("Thrombokinase" nach Morawitz und "Cytozym" nach Fuld). Demnach enthält der Blutegelauszug nur ein Antithrombon, keine Antikinase. **Melanby** (1909) /173/ schrieb seinerseits dem Antikoagulans die Eigenschaften eines Antikinase-Antifibrin-Fermentes zu, das eine Hemmung der Thrombinbildung und Thrombinwirkung verursacht.

Bodong (1904) /18/ nahm an, daß die inhibitorische Wirkung durch die Bindung des Hirudins an Fibrinogen zustande käme, wodurch das Fibrinogen verändert würde und nicht mehr gerinnungsfähig sei. **Schittenhelm** (1905) /217/ hingegen bewies in seinen Versuchen, daß der Hemmstoff nicht mit dem Fibrinogen reagiert. Zudem glaubten Schittenhelm et al. nicht an eine direkte Wirkung des Inhibitors auf die Kinase oder das

Thrombogen, sondern an eine Beeinflussung dieser Enzyme durch eine in Blut, Plasma und Serum (nicht aber in Gewebesaft oder in Blutplättchen) vorhandene noch unbekannte Substanz, die den Hirudinüberschuß neutralisiere.

Gratia (1921) /70/ vertrat wie Melanby die Ansicht, daß Hirudin hauptsächlich in die der Thrombinbildung vorausgehenden Prozesse eingreift und sich entsprechende Mengen Hirudin und Thrombin unter Bildung einer kolloidalen Verbindung neutralisieren. Beim Erhitzen zerfalle dieser Komplex, wobei das Hirudin wieder frei werde.

Jürgens (1928) /103/ stellte anhand von Tierversuchen neben einem Einfluß des Hemmstoffes auf Thrombogen auch eine Störung der gerinnungsfördernden Endothelfunktion fest, die für die Fixation von Blutplättchen und Fibrin an die Gefäßwand notwendig ist.

Unabhängig von der Reindarstellung des Hirudins wiesen Waldschmidt-Leitz et al. (1929) /264/ die Eiweißnatur des Inhibitors durch eine spezifische Eiweißreaktion, die Proteolyse, nach. Durch Einwirkung bestimmter proteolytischer Enzyme wie Pepsin, Trypsin-Kinase und Papain-Blausäure ging die blutgerinnungshemmende Aktivität der hirudinhaltigen Extrakte verloren. Demzufolge handelte es sich bei dem "aktiven Prinzip" nicht nur um einfache Peptide, sondern um einen höhermolekularen Einweißstoff.

Erst detailliertere Kenntnisse über die biochemischen Vorgänge im Gerinnungsablauf und die Anwendung subtilerer Methoden in der Eiweißchemie ermöglichten eine exakte Charakterisierung dieses Wirkstoffes.

Mit der Darstellung einer elektrophoretisch und chromatographisch homogenen Substanz gelang es Markwardt, das Hirudin als kohlenhydratfreies Polypeptid zu identifizieren /144, 148/ sowie seine Aminosäurezusammensetzung und seinen Wirkungsmechanismus aufzuklären /145/

Der Angriffspunkt des Hirudins im Gerinnungssystem wurde durch Analyse seiner Inhibitorwirkung auf die einzelnen Phasen der Gerinnungskaskade sowie durch seine Reaktionsbereitschaft gegenüber den einzelnen gereinigten Blutgerinnungsfaktoren eruiert. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, daß das Hirudin mit dem Gerinnungsferment Thrombin einen inaktiven, elektrophoretisch und chromatographisch nachweisbaren Assoziationskomplex bildet, wodurch die katalytische Wirkung des Thrombins erlischt. Hirudin entfaltet seine Aktivität unabhängig von der Mitwirkung oder Anwesenheit anderer Komponenten des Blutes. Es ist ein spezifischer, aber kein artspezifischer Thrombininhibitor, d.h. es hemmt Thrombine sehr verschiedener Spezies, auch wenn diese phylogenetisch weit voneinander entfernt sind. Die Untersuchung dieser spezifischen Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin ergab, daß eine bestimmte Hirudinmenge stets eine äquivalente Thrombinmenge hemmt; die Reaktion verläuft stöchiometrisch. Hieraus ergab sich die Möglichkeit, eine quantitative und reproduzierbare Hirudinbestimmung durch Titration mit standardisiertem Thrombin durchzuführen /145/.

Untersuchungen mit Citratblut zeigten eine Beschleunigung der Gerinnung des Hirudinblutes nach Thrombokinasezusatz, die auf einer Erhöhung der Umwandlungsgeschwindigkeit des Prothrombins in Thrombin und somit der Neutralisation von Hirudin nach Recalcifizieren des Citratblutes beruht. Vollständig durch Hirudin blockierte Ansätze koagulierten allerdings auch nicht nach Zugabe größerer Thrombokinasemengen /145/.

Untersuchungen unter Verwendung gereinigter Gerinnungsfaktoren ergaben, daß eine Fibrinogenlösung nach Hinzufügen einer bestimmten Thrombinmenge koagulierte, während hirudinhaltige Fibrinogenlösungen nach Zugabe äquivalenter Thrombinmengen ungerinnbar blieben; d.h., das Gerinnungsferment war nicht mehr in der Lage, das Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln.

Die Lösung gerann erst durch Zusatz von Thrombin im Überschuß /145/.

Die Wirksamkeit des Hirudins wird in Antithrombin-Einheiten (AT-E) angegeben. 1 AT-E ist die Menge Hirudin, die 1 NIH-E Thrombin (NIH = National Institute of Health) in seiner Wirkung auf Fibrinogen unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen blockiert. 1 AT-E entspricht 0,12 Gamma an reinem Hirudin /144/.

2.1.2.1 Chemische und physikalische Eigenschaften

Hirudin ist in wäßriger Lösung bei Ausschaltung mikrobieller Zersetzung über 6 Monate und in trockenem Zustand über Jahre haltbar /158,148/.

Bei speziellen qualitativen Farbreaktionen färbt sich Hirudin auf dem Elektrophoresestreifen mit Amidoschwarz 10 B blau an, mit Ninhydrin bei 100° C violett und nach Einwirkung von Pauly's Diazoreagens rot /148/.

Hirudin wird aus Lösungen durch Zugabe des gleichen Volumens von Eiweißfällungsreagenzien wie Tanninlösung, 10%ige Phosphorwolframsäurelösung und gesättigte Pikrinsäurelösung ausgefällt. 10%ige Trichloressigsäure verursacht keine Präzipitation /148/. Die Nitroprussidnatriumreaktion nach Behandlung mit Natriumcyanid und die Biuretreaktion waren positiv, ebenso die Reaktion auf Tyrosin mit Alpha-Nitroso-beta-naphthol. Nachweisreaktionen auf Tryptophan, Arginin, Polysaccharide, Hexosen und Phosphat verliefen negativ /148/.

Der Hemmstoff ist gegenüber denaturierenden Einflüssen ziemlich stabil. In Tabelle 5 ist die Wirkung einiger denaturierender Stoffe auf die biologische Aktivität des Hirudins zusammengefaßt /255/. Bemerkenswert ist auch die Hitzebe-

ständigkeit dieses Polypeptids; ein 15 min langes Erhitzen auf 80° C hat keinen Aktivitätsverlust zur Folge. Bei 90° C verliert Hirudin ca. 18% und bei 100° C ca. 37% seiner Wirksamkeit /148/. Die Hitzebeständigkeit nimmt mit steigendem pH-Wert ab, während eine pH-Verminderung eine gewisse Stabilisierung ausübt /148,150/.

Tab. 5: Einfluß denaturierender Stoffe auf die Antithrombinaktivität des Hirudins nach Tertrin et al. /255/

Reagens	Aktivitätsverlust in [%]	Chemische Veränderungen
50%iges Äthanol	0	Spaltung hydrophober Bindungen
80%iges Butanol	0	
80%iges Dioxan	0	
99%ige Ameisensäure	5	Spaltung von Wasserstoffbindungen
alkalische Lösung (pH 12)	0	Dissoziation der OH-Gruppen des Tyrosins; evtl. Spaltung von Disulfidbrücken
8 M Harnstoff	0	Spaltung von H-Brücken und hydrophoben intramolekularen Bindungen

Weiterhin wurde der Effekt proteolytischer Enzyme auf die Hirudinaktivität (siehe Tabelle 6) untersucht. Diese Enzyme fanden auch für strukturanalytische Untersuchungen des Inhibitormoleküls Anwendung. Die Hemmwirkung des Hirudins blieb nach 24-stündiger Inkubation mit Plasmin, Trypsin und Chymotrypsin A unbeeinflußt. Elektrophoretisch zeigte das mit Trypsin oder Chymotrypsin A inkubierte Hirudin das gleiche Verhalten wie der unbehandelte Inhibitor. Das mit Perameisensäure oxidierte Hirudin wurde hingegen durch Trypsineinwirkung in mehrere Spaltprodukte zerlegt, die mittels Austauscher- und papierchromatographischer Auftrennung nachgewiesen werden konnten. Es wird angenommen, daß für die Resistenz des Hirudinmoleküls gegen die o.g. Proteasen die kompakte Tertiärstruktur des Inhibitors verantwortlich ist /171/.

Durch Inkubation mit Pepsin, Subtilopeptidase A und Papain wurde die Hemmaktivität vollständig zerstört /171/.

Tab. 6: Einfluß proteolytischer Enzyme auf die Hirudinaktivität nach Markwardt und Walsmann /171/

	Zerstörte Hirudinaktivität [%]			
Inkubationszeit [h]	0	2	6	24
Trypsin	0	0	0	0
Chymotrypsin A	0	0	0	0
Pepsin	0	82	95	100
Papain, pH 7,5	0	0	0	0
pH 4,0	0	36	36	92
Subtilopeptidase A	0	29	54	89
Plasmin	0	0	0	0
Kontrolle ohne Ferment	0	0	0	0

Die von verschiedenen Arbeitskreisen ermittelten physikochemischen Daten des Hirudins sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tab. 7: Physiko-chemische Charakteristika des Hirudins

Charakteristikum	Wert	Berechnung aus	
Molekulargewicht	10 800	Aminosäurezusammensetzung	/163/
	13 000	" "	/254/
	9 060	Analytische Ultrazentrifugation	/258/
	12 200	" "	/5,4/
	13 000	N-terminaler Aminosäurerest	/254/
	12 500	C-terminaler Aminosäurerest	/254/
	15 000	Sephadex-Gelfiltration	/254/
	7 100	" "	/14/
	10 000	Sedimentationskonstante	/254/
Isoelektrischer Punkt	3,8	Papierelektrophorese	/148/
	4,0	" "	/144/
	3,9	Trägerfreie Elektrophorese	/163/
	4,0	Isoelektrische Fokussierung	/254/
	3,9	" "	/13/
Partielles spezifisches Volumen $\bar{v}$ [cm^3/g]	0,741	Dichtemessungen	/258/
	0,741	"	/156,4/
	0,71	"	/254/
Sedimentationskonstante (S) $s^{\circ}_{20,w}$	0,98	Ultrazentrifuge	/156,258/
	1,37	"	/254/
	1,01	"	/266/
Diffusionskonstante (F) $D^{\circ}_{20,w}$	10,8	Ultrazentrifuge	/258/
	11,5	Diffusion in Agar	/254/
Molares Reibungsverhältnis f/f_o	1,42	Ultrazentrifuge	/156,258/
	1,2	Diffusionskonstante	/254/
Moleküldimension Längsachse	110 Å		/258/
Querachse	14 Å		/258/
Elektrophoretische Beweglichkeit	$6,6 \times 10^{-5} cm^2/V/sec$ bei pH 5,0 und Ionenstärke 0,1		/156,266/

Der hohe Gehalt an Glutamin- und Asparaginsäure des Hemmstoffes ist für den isoelektrischen Punkt im sauren Bereich verantwortlich /266/.

Dialyse und Ultrafiltrationsversuche zeigten, daß Hirudin durch Cellophanmembranen und Membranfilter von mittlerer Porenweite (5 mμ) zurückgehalten wird. Ungehindert passierte es Collodiummembranen von mittlerer Porenweite (30 mμ) sowie Ultrafeinfilter von mittlerer Porenweite (20-10 mμ) /148/.

2.1.2.2 Aminosäurezusammensetzung

Die erste Aminosäurezusammensetzung des hochgereinigten Polypeptids Hirudin wurde 1957 von Markwardt ermittelt. Das zunächst angewandte Analysenverfahren bestand in der sauren Hydrolyse des Inhibitors und Vortrennung des Hydrolysates in saure, basische und neutrale Aminosäuren mittels Hochspannungsionophorese sowie in der anschließenden qualitativen und quantitativen Bestimmung durch ein- und zweidimensionale Papierchromatographie /148,150,156,171/.

Später wurde nach 24-, 48- und 70stündiger saurer Hydrolyse in 6 N HCL bei 110° C die Analysenmethode von Spackmann, Stein und Moore /177/ bevorzugt, die jedoch nur geringe quantitative Unterschiede gegenüber der o.g. Vorgehensweise ergab /171/.

Nach Markwardt bestimmten noch andere Arbeitsgruppen die Proteinbausteine des Hirudins. Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 8 die einzelnen qualitativen und quantitativen Analysenergebnisse vergleichend gegenübergestellt.

Tab. 8: Bausteine homogener Hirudinpräparate

	Markwardt /148,156, 150,171/	la Llosa Llosa /135/	Baskova et al. /12,14/	Bagdy et al /4,5/	Petersen et al. /198/
Ausgangs-material	Gewinnung eines homogenen Hirudins aus				
	Blutegelköpfen			ganzen Egeln	
Molekulargewicht	9 060	13 000	7 100	12 200	ca.7 300
Analysenmethode (6 N HCl bei 110 °C)	70 h	72 h	24 h	40 h	
Aminosäure	Anzahl der Aminosäurereste / Molekül				
Asparaginsäure	10	15-17	12	14	9
Glutaminsäure	13	17-19	14	16	13
Cystin/2 *	6	6	6	6	6
Serin	4	8	4	8	4
Glycin	9	14	9	13	8
Threonin	4	8	5	6	4
Alanin	1	1	2	3	-
Valin	3	7	3	7	4
Leucin	4	7	4	5	4
Isoleucin	2	4	4	3	2
Prolin **	3	7-9	5	6	3
Phenylalanin	2	2	1	2	1
Tyrosin ***	2	2-3	2	3	2
Histidin	1	2	2	2	1
Lysin	3-4	5	4	5	3
Arginin	-	-	1	-	-
Methionin*	-	3-4	-	-	-

* Nach Oxidation mit Perameisensäure als Cysteinsäure und Methioninsulfoxid bestimmt /171/.

** Eigens durch Anfärbung mit Isatinreagenz bestimmt /148/.

*** Mit Alpha-Nitroso-beta-naphthol und aus dem UV-Absorptionspektrum bestimmt /155/.

Die geringen Differenzen zwischen den einzelnen Aminosäurezusammensetzungen wurden auf restliche Verunreinigungen in den Präparaten zurückgeführt. Die normalerweise in natürlichen Proteinen vorkommenden Proteinbausteine Arginin, Methionin und Tryptophan /171/ fehlen in den meisten Hirudinpräparationen. So wurde Arginin nur von Baskova et al. /12, 14/ und Methionin nur von de la Llosa et al. /135/ nachgewiesen. Die Abwesenheit von Tryptophan in allen aufgeführten Aminosäurebestimmungen wurde durch die spektralphotometrische Analyse des Hirudins bestätigt /171,135,110/. Petersen et al. /198/ fanden in ihren Hirudinpräparaten kein Alanin.

Die Elementaranalyse des Inhibitors ergab folgende prozentuale Zusammensetzung: C 43,38%; H 6,71%; N 13,44%; S 2,39%. Der relativ hohe Schwefelgehalt liegt in Form von Cystin vor /171/.

2.1.2.3 Endgruppen-Identifizierung

a) N-terminale Aminosäure

De la Llosa et al. (1962) /135/ bestimmten Leucin bzw. Isoleucin als N-terminale Aminosäure des Hirudinmoleküls. Zur Bestimmung wurde zunächst eine Dinitrophenyl-Hirudinlösung gegen 1%iges Natriumbicarbonat und Aqua dest. dialysiert, danach das lösliche DNP-Hirudin durch HCl bei pH 2,0 ausgefällt und getrocknet. Nach 16-stündiger saurer Hydrolyse (5,7 N HCl bei 110° C) wurde die mit Äther extrahierte N-terminale DNP-Aminosäure mittels bidimensionaler Papierchromatographie in zwei verschiedenen Systemen identifiziert, und nach Elution mit 1%igem Natriumbicarbonat quantitativ spektralphotometrisch analysiert.

Mit der Methode nach Nedkov und Genov /188/ isolierten Markwardt und Walsmann /171/ als N-Terminus die Aminosäure

Isoleucin. Zuvor wurde das Hirudin nach dem Verfahren von Gray und Hartley /71/ in 0,1 M Natriumbicarbonatlösung mit Dansylchloridlösung umgesetzt und einer 12-14stündigen sauren Hydrolyse (6 N HCl bei 105° C) unterworfen. Die N-terminale Aminosäure wurde anschließend mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt /171/.

Nicht übereinstimmend mit diesem Ergebnis fanden Graf et al. (1972) /69/ als N-terminale Aminosäure ihrer Hirudinpräparate Valin. Sie wandten die Dansyl-Methode nach Gray /72/ und den Peptidabbau nach Edman /283/ zur Identifizierung des Phenylthiohydantoinderivates (PTH-Aminosäure) des endständigen Restes an. Chromatographisch /177/ stellte sich die PTH-Aminosäure als homogenes Valin dar. Zusätzlich wurde im Dansyl-Verfahren als zweiter Aminosäurerest ebenfalls Valin bestimmt. Somit ergab sich hier als aminoterminale Aminosäuresequenz des Hirudins Val-Val. Aus diesen Ergebnissen folgerten die Autoren, daß das gegen saure Hydrolyse resistente Dipeptid Val-Val irrtümlicherweise von den erstgenannten Arbeitsgruppen für Leucin bzw. Isoleucin gehalten wurde /69/.

Bemerkenswert ist, daß die Endgruppierung Val-Val in den Hirudinpräparaten vorkam, die aus ganzen Blutegeln gewonnen wurden /5,69/. Das veranlaßte Baskova et al. /12/ vergleichende Studien über Hirudinpräparate aus Blutegelköpfen, -körpern und ganzen Egeln durchzuführen. Für die Analysen wandten sie ebenfalls die Dansyl-Methode nach Gray /72/ an. Die Autoren stellten fest, daß für die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Hirudinpräparationen vornehmlich die Quelle des Ausgangsmaterials verantwortlich sei. Dementsprechend bestätigten sie das Isoleucin als N-Terminus des Hirudins aus Egelköpfen und das Valin als Endgruppe bei Isolierungen aus ganzen Blutegeln.

Diese Ergebnisse bekräftigten die Theorie von Petersen et al. /198/ über die Existenz von zwei Isoformen des Hirudins, d.h. einer Isoleucin- und einer Valin-Form, während Baskova et al. /12/ die Valin-Form dem sogenannten "Pseudohirudin",

einem so gut wie inaktiven Material des Blutegelkörpers zuordneten. Ausführlich wird über das "Pseudohirudin" im Kapitel 2.2 berichtet.

b) C-terminale Aminosäure

Der Arbeitskreis um Jutisz (1964) /136/ analysierte auch die C-terminale Aminosäuresequenz des Hirudins und ermittelte -Ala-Gly-Ser-Glu(NH_2)-Leu(OH).

Nach 2-stündiger enzymatischer Hydrolyse von nativem Hirudin bzw. seinen DNP-Derivaten mittels Carboxypeptidase A (bei 28° C, pH 8,0 (0,5% $NaHCO_3$); Substratkonzentration 1 mg/ml, Substrat/Enzym-Verhältnis = 50) und nachfolgender Behandlung des Hydrolysates mit Fluorodinitrobenzol (pH 8,0) nach der Methode von Sanger wurden die freien DNP-Aminosäuren nach Ansäuerung mit Äther extrahiert, dialysiert und getrocknet. Das verbleibende Protein wurde erneut diesem Abbauvorgang unterzogen. Die DNP-Aminosäuren wurden mittels zweidimensionaler Papierchromatographie identifiziert und quantitativ spektralphotometrisch bestimmt. Eine sichere Differenzierung zwischen Leucin und Isoleucin, die papierchromatographisch schwierig schien, erreichten die Autoren durch Dünnschichtchromatographie der freien Aminosäuren an Cellulose. Sie bestätigten sowohl das Leucin als auch das Glutamin im C-Terminus /136/.

Weiterhin wurde versucht, die C-endständige Sequenz mittels Hydrazinolyse zu bestimmen. Hierzu wurde der in Hydrazinanhydrid gelöste Inhibitor 8 bis 64 h auf 100° C erhitzt, wodurch das Hydrazin verdampfte und die Aminosäuren des Hydrazinolysates analysiert werden konnten. Trotz der langen Inkubationszeit fand nur ein unvollständiger Abbau des Inhibitormoleküls statt, dennoch stellte sich wie oben bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Hydrazinolysates Leucin und nicht Isoleucin dar /136/.

Petersen et al. (1976) /198/, Chang (1983) /24/ und Dodt et al. (1984) /33/ ermittelten bei der Sequenzanalyse die C-terminale Sequenz des Hirudins -Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln durch enzymatischen Abbau mittels Thermolysin bzw. Carboxypeptidase Y.

2.1.2.4 Primärstruktur des Hirudins

Petersen et al. (1976) /198/ gelang es, die Primärstruktur des Hirudinmoleküls weitgehend aufzuklären. Für die Aminosäuresequenzanalyse verwendeten sie ein aus ganzen Blutegeln nach dem Isolierungsverfahren von Bagdy et al. /5,4/ gereinigtes Hirudin, das folgenden enzymatischen Abbauvorgängen unterworfen wurde:

1) **Tryptische Spaltung:** Nach 4-stündiger Denaturierung und Reduktion des Hirudins mit Dithiothreitol in 6 M Guanidinchlorid, 0,5 M Tris-HCl vom pH 8,0 bei 60° C sowie anschließender Aminoäthylierung und Entsalzung in 0,2 M Essigsäure über Sephadex G-25 wurde der gefriergetrocknete Wirkstoff mit Diphenyl-carbamylchlorid vorbehandeltem Trypsin inkubiert und die resultierenden Peptide mittels Hochvolt-Papierelektrophorese aufgetrennt.

2) **Thermolytische Spaltung:** Auch hier wurde Hirudin denaturiert, reduziert, carboxymethyliert, in 0,1 M Ammoniumbicarbonat über Sephadex G-50 entsalzt, gefriergetrocknet und anschließend 4 h bei 45° C mit Thermolysin in 1%igem Pyridinacetat vom pH 6,7 (2 mM Calciumchlorid) inkubiert. Die Peptide wurden an DEAE-Cellulose mittels eines linearen Ammoniumbicarbonat-Gradienten von 0,02-0,2 M und 0,2-1,0 M aufgetrennt und mittels Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie isoliert.

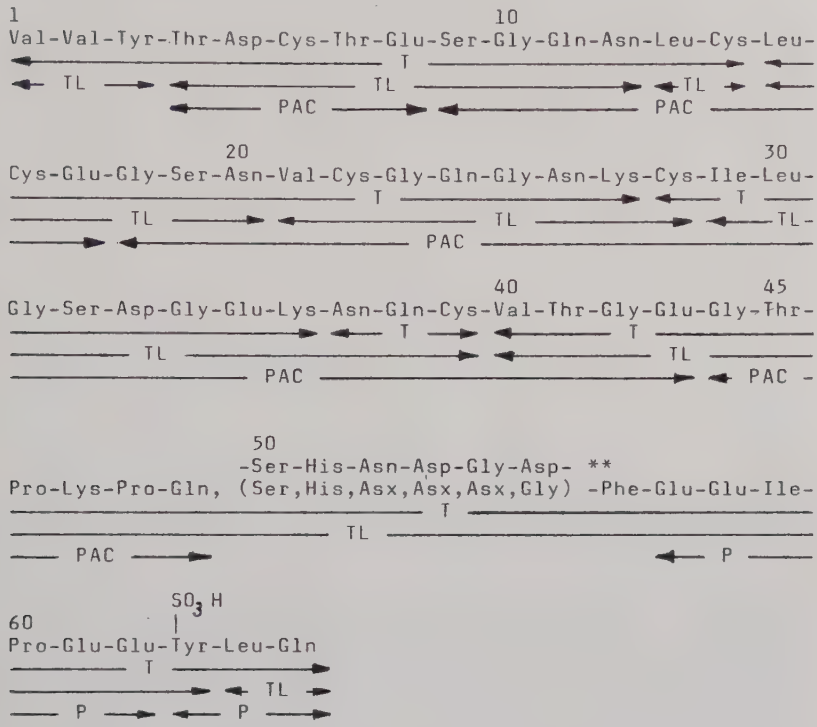
3) **Peptische Spaltung:** Hirudin wurde in 98%iger Ameisensäu-

re gelöst (30 min Einwirkungsdauer), danach wurde mit Wasser bis zu einer Ameisensäurekonzentration von 5% verdünnt und anschließend 4 h bei 37° C mit Pepsin inkubiert. Nach Trennung der hochmolekularen von den niedermolekularen Peptiden in 0,15 M Ammoniumbicarbonat an Sephadex G-50 wurden die niedermolekularen Peptide durch Hochvolt-Papierelektrophorese isoliert. Da die Lokalisation der Disulfidbrücken im Hirudinmolekül durch die peptische Spaltung nicht bestimmt werden konnte, wurden die hochmolekularen Peptidfraktionen des peptischen Abbaus mit Perameisensäure oxidiert und mittels einer für die Spaltung von Glutamyl-Bindungen spezifischen Serinprotease aus Staphylokokken sowie durch Chymotrypsin verdaut. Die resultierenden Peptide wurden ebenfalls mittels Hochspannungspapierelektrophorese isoliert.

In Abbildung 9 ist die mit Hilfe dieses enzymatischen Abbaus ermittelte aus 65 Aminosäuren bestehende Sequenz des Hirudins schematisch dargestellt. Diese Anzahl an Proteinbausteinen stimmt mit der von Markwardt und Walsmann angegebenen, aus der Aminosäurezusammensetzung bestimmte Zahl gut überein /198/.

Die Lage der Disulfidbrücken wurde bislang noch nicht festgelegt. Die gefundene Endgruppe Val-Val bestätigt den von Graf et al. /69/ ermittelten N-Terminus, die C-terminale Sequenz -Leu-Gln unterscheidet sich jedoch von den Angaben (-Gln-Leu) von de la Llosa et al. /136/.

Abb. 9: Aminosäuresequenz des Hirudins nach Petersen et al. /198/ mit Ergänzungen von Dodt et al. /33/:



** ermittelt von Dodt et al. mittels Mikrosequenzanalyse /33,282/

T = Aus der tryptischen Spaltung des reduzierten, aminoäthylierten Hirudins hervorgegangene Peptide.

TL = Aus der thermolytischen Spaltung des reduzierten und carboxymethylierten Hirudins resultierende Peptide.

P = Peptide der peptischen Spaltung des nativen Hirudins.

PAC= Aus der Spaltung der mittels Perameisensäure oxidierten peptischen Peptide durch Inkubation mit Staphylokokken-Protease und Chymotrypsin erhalten.

Das mit einer O-Sulfatgruppe veresterte Tyrosin in Pos. 63 trägt eine negative Ladung sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 2,1 und wurde aufgrund der anormalen elektrophoretischen Mobilität des peptischen Peptids $TyrSO_3$-Leu-Gln ermittelt. Die Isolierung des freien Tyrosin-O-Sulfates vom Peptid erfolgte durch Abbau mit Carboxypeptidase A und Identifizierung mittels Elektrophorese bei pH 6,5 und 2,1 im Vergleich zu synthetischem Tyrosin-O-sulfat, Tyrosin-O-phosphat und sulfonierten Tyrosin. Die Funktion des Tyrosin-O-sulfates im Hirudinmolekül ist nicht bekannt. Es erhebt sich die Frage, ob es an der Bindung des Thrombins mitverantwortlich ist, da außer Hirudin auch Fibrinogen und Heparin (die beide Thrombin spezifisch binden) diese Sulfatestergruppen enthalten /198/.

Homologien in der Sequenz finden sich zwischen dem Hirudinmolekül in Position 40-48 und dem Prothrombinmolekül in Position 149-157.

	40							48
Hirudin	-Val-	Thr-	Gly-	Glu-	Gly-	Thr-	Pro-	Lys-Pro-
	149							157
Prothrombin	-Val-	Thr-	Val-	Glu-	Val-	Ile-	Pro-	Arg-Ser-

Diese Analogien sind von besonderem Interesse, da Thrombin die Peptidbindung Arg-Ser in Position 156-157 bei der Umwandlung des Prothrombins in Neoprothrombins-S spaltet und somit möglicherweise in der Sequenz 149-157 des Prothrombins Haftstellen für Thrombin lokalisiert sind. Dies bewog die Autoren zu der Annahme, daß für die Bindung des Thrombins an Hirudin die Aminosäurereste Val 40, Thr 41, Glu 43, Pro 46 und Lys 47 im Hirudinmolekül von Bedeutung sind. Es wurde auch vermutet, daß der Prolinrest in Position 48 dafür verantwortlich ist, daß Thrombin die Peptidbindung in Position 47-48, Lys-Pro, im Hirudinmolekül nicht spalten kann, da von anderen Serinproteasen wie z.B. Trypsin bekannt ist, daß sie Arg-Pro- und Lys-Pro-Bindungen, trotz ihrer hohen Affinität zu Arginyl- und Lysylbindungen, nicht spalten /198/.

Zusätzlich zu den genannten Peptiden wurden noch weitere isoliert. Die Sequenzen dieser Peptide kamen nicht in allen durchgeführten Abbauprozeduren vor und wurden infolgedessen nicht dem Hirudinmolekül zugerechnet. Weiterhin ergab die Strukturanalyse des Inhibitors keinen Anhalt für das Vorhandensein von Kohlenhydratresten im Molekül /198/.

2.1.3 Wirkspektrum des Hirudins

2.1.3.1 Inhibitorwirkung gegen Thrombin

Thrombin

Im vorstehenden Kapitel wurde bereits die spezifische Affinität des Hirudins zum Gerinnungsferment Thrombin erwähnt. Die Serinprotease Thrombin ist ein Glycoprotein, das aus 309 Aminosäuren und einem Kohlenhydratanteil von 5% aufgebaut ist. Das Enzym besteht aus einer A-Kette (MG 4 600) und einer B-Kette (MG 32 000), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die Triade His 57/ Asp 102/ Ser 195 bildet den katalytisch aktiven Teil des Enzyms und ist in der B-Kette lokalisiert. Die A-Kette scheint für die Substratspezifität mitverantwortlich zu sein. Der Kohlenhydratanteil ist an der B-Kette gebunden. Normales Plasma enthält ca. 200 NIH-E Thrombin bzw. Prothrombin pro Milliliter /81, 43,142,98,30/.

Thrombin entsteht durch limitierte Proteolyse des zirkulierenden Prothrombins. Der Umwandlungsprozeß erfolgt schrittweise über die Bildung mehrerer Zwischenstufen /43,98,142, 30/. Diese Reaktion wird von Faktor Xa in Gegenwart von Ca++, Phospholipid und Faktor Va (auch Prothrombinase-Kom-

plex bezeichnet /142/) katalysiert. Das primäre Produkt des Aktivierungsvorganges ist Alpha-Thrombin, das sich durch eine sehr hohe Gerinnungs- und Esteraseaktivität auszeichnet. Reines Alpha-Thrombin hat eine spezifische Gerinnungsaktivität von ca. 3 NIH-E/mg Protein /43/.

Durch limitierte Autolyse des Alpha-Thrombins entstehen die Abbauprodukte Beta- und Gamma-Thrombin. Diese Derivate haben nur eine unbedeutende Gerinnungsaktivität, jedoch eine esterolytische Wirkung gegenüber synthetischen Substraten /43/.

K.G.Mann /142/ vertritt die Auffassung, daß Beta- und Gamma-Thrombin nicht während des rasch verlaufenden Prothrombin-Aktivierungsprozesses gebildet werden, sondern als Abbauprodukte in den meisten Handelspräparaten enthalten sind.

Der Hirudin-Thrombin-Komplex

Thrombin und Hirudin bilden in einer stöchiometrischen Reaktion einen inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplex, der sich im pH-Bereich zwischen 4,0 und 10,0 durch eine außerordentlich geringe Dissoziation auszeichnet und als solcher im elektrischen Feld wandert. Bei pH 7,4 und 20° C wurde für den Komplex eine Dissoziationskonstante K_i von 82 pmol/l /157/ ermittelt. Der isoelektrische Punkt dieses Komplexes liegt zwischen dem Wert des freien Thrombins (pH 4,7) und des freien Hirudins (pH 3,8) bei pH 4,3 /148,169,255,157/.

Im sauren (pH $<$ 4) als auch im alkalischen (pH $>$10) Milieu dissoziiert der Komplex in seine Komponenten. Dieser pH-Effekt sowie die sehr rasch ablaufende Komplexbildung deuten daraufhin, daß die Enzym-Inhibitor-Interaktion durch polare Gruppen in spezifischer räumlicher Anordnung in den Molekülen entscheidend beeinflußt wird. Ionisierbare Gruppen dieser Proteine sind einerseits die endständigen Alpha-Carboxylgruppen (pK 3,0-3,2), die freien Carboxylgruppen der Asparaginsäure (pK 3,0-4,7) und der Glutaminsäure (pK 4,4)

sowie die freien Aminogruppen (pK 9,4-10,6) /169,150,265/. Zur weiteren Klärung des Reaktionsmechanismus wurde der Einfluß einer Neutralisation dieser Gruppen durch chemische Umsetzung auf die Bildung bzw. Dissoziation des Komplexes untersucht /169/; die Komplexdissoziation ist dabei zumeist mit einer Denaturierung des Thrombins verbunden (siehe Kapitel 2.1.3.1.1).

Die Komplexbildung verläuft schneller als die Reaktion des Thrombins mit seinem spezifischen Substrat, dem Fibrinogen, und führt praktisch zur sofortigen Hemmung der Enzymaktivität. Es zeigte sich auch, daß die Wirkung des Hirudins von der Fibrinogenkonzentration völlig unabhängig ist /169/ und die Einwirkungszeit der Komponenten - bei einer Temperatur zwischen 10° und 40° C - für die Thrombin-Hirudin-Komplexbildung keine Rolle spielt /145/.

Bei den enzymkinetischen Untersuchungen zur Klärung des Mechanismus der Thrombinhemmung wurde eine kontinuierliche Messung der Thrombinaktivität über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Hierzu erwies sich die hydrolytische bzw. esterolytische Wirkung des Thrombins auf niedermolekulare synthetische Subtrate wie p-Toluolsulfonyl-L-arginin-methylester (TAME) als besonders geeignet /233/. Die fermentative Hydrolyse dieses Substrates durch Thrombin konnte anhand der fortlaufenden Neutralisation der freiwerdenden Carboxylgruppen bestimmt werden. Diese kontinuierliche Messung der Thrombinwirksamkeit war bei der Katalyse der Fibrinogenumwandlung nicht möglich /266,168,155,169/.

Mit Hilfe von TAME konnte die Hemmung der Enzymaktivität durch Hirudin in einem weiten pH-Bereich analysiert werden. Die Resultate stimmten mit den Ergebnissen zuvor durchgeführter elektrophoretischer Untersuchungen überein und ergaben, daß die Hemmung des Enzyms sich in einem breiten pH-Bereich nicht ändert und erst bei starken pH-Abweichungen ($< pH\ 4,0$ und $> pH\ 10$) durch Dissoziation des Komplexes verringert wird /266,168,155,169/.

Außerdem zeigte sich, daß Hirudin auch die TAME- d.h. die esterspaltende Wirkung des Thrombins hemmt, während TAME die Inhibitorwirkung des Hirudins gegen Thrombin normalerweise nicht beeinflußt /169/. Lag jedoch das synthetische Substrat in höherer Konzentration vor, so wurde festgestellt, daß TAME Hirudin vom Thrombin verdrängte. Hieraus ist zu folgern, daß bei der Thrombin-Hirudin-Reaktion das aktive Zentrum des Enzyms reversibel blockiert wird /266/, d.h. das Substrat und der Inhibitor konkurrieren um das aktive Zentrum des Enzyms.

Über den Einfluß einer chemischen Modifizierung durch gruppenspezifische Reagenzien auf die biologische Aktivität der Hirudin- bzw. Thrombinmoleküle konnten die an der Enzym-Inhibitor-Interaktion beteiligten reaktiven Gruppen identifiziert werden.

2.1.3.1.1 Zur Antithrombinaktivität von chemisch modifiziertem Hirudin

Reaktionsfähige Gruppen am Hirudinmolekül sind die freien Carboxylgruppen, die freien Aminogruppen, die aliphatischen OH-Gruppen des Serins und Threonins, die phenolische OH-Gruppe des Tyrosins, die Imidazolgruppe des Histidins und die Disulfidgruppe des Cystins /155/. In Tabelle 9 wird der Einfluß einiger gruppenspezifischer Reagenzien auf die biologische Aktivität des Hirudins wiedergegeben.

Tab. 9: Einfluß einiger gruppenspezifischer Reagenzien auf die biologische Aktivität des Hirudins nach den Ergebnissen von Tertrin et al. /255/, Markwardt /155/, Walsmann /266/.

Reagens	Aktivitätsverlust [%]	Reaktionsfähige Gruppen bzw. Effekt	Reaktionsweise
Perameisensäure	95	Spaltung der S-S-Brücken	Oxidation
Natrium-Borhydrid *	70	S-S-Brücken-Teilspaltung	Reduktion
Diazomethan	100	Veresterung freier Carboxylgruppen	Veresterung
Essigsäureanhydrid	72	Blockierung endständiger Aminogruppen, OH-Gruppen (Tyrosin)-Teilblockierung	Acetylierung
1-Fluor - 2.4. Dinitrobenzol	80	Blockierung freier Aminogruppen, OH-Gruppen(Tyrosin), Imidazol (Histidin)	Dinitrophenylierung
Kaliumcyanat	60	Teilblockierung freier Aminogruppen (Lysin)	Carbamylierung
5-Diazo-1H-Tetrazol	60	Blockierung von Imidazol (Histidin)	Additionsprodukte
p-Diazobenzolsulfonsäure	45	Blockierung phenolischer OH- und Imidazolgruppen	
N-Acetyl-Imidazol	35	OH-Gruppen-Blockierung (Tyrosin), Teilhemmung freier Aminogruppen (Lysin)	Acetylierung
Salpetrige Säure	15	Blockierung freier Aminogruppen	Desaminierung
Formaldehyd	20	" " "	
Konz. Schwefelsäure	20	Blockierung aliphatischer OH-Gruppen	
Natriumsulfit	5	S-S-Brücken-Reduktion	Reduktion
Natriumdithion	0	S-S-Brücken-Reduktion	"

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist, geht die Oxidation der Disulfidbrücken des Hirudinmoleküls, und nach dem Ergebnis von Tertrin et al. /255/ auch die Reduktion, mit dem Verlust der Antithrombinaktivität einher. Demzufolge spielt die Integrität der Tertiärstruktur des Moleküls eine wichtige Rolle für seine biologische Aktivität /255/. Ebenso sind die freien Carboxylgruppen des Hirudinmoleküls für seine inhibitorische Wirkung gegenüber Thrombin von entscheidender Bedeutung. Durch Veresterung dieser Gruppen erlischt die Affinität zum Enzym. Diese Reaktion ist jedoch reversibel. Durch eine schonende Verseifung bei 0° C mit 0,01 N NaOH wird die Ausgangsaktivität fast vollständig zurückerlangt /266/, so daß eine unspezifische Denaturierung des Inhibitors ausgeschlossen werden kann. Tertrin et al. /266/ schreiben auch den freien Aminogruppen und dem Imidazolring der Histidinreste eine gewisse Bedeutung für die Wirksamkeit des Hemmstoffes zu, während Markwardt in früheren Untersuchungen dies für die freien Aminogruppen verneinte /169,150/.

2.1.3.1.2 Affinität des Hirudins zu chemisch modifiziertem Thrombin

Zur weiteren Klärung der molekularen Interaktionen zwischen Enzym und Inhibitor wurde Thrombin chemisch verändert und die Reaktionsfähigkeit solcher Thrombine gegenüber dem unveränderten Hirudin analysiert.

a) Hirudin und Esterase-Thrombin

Durch Acetylierung der freien Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid /156,126/ oder ihre Blockierung mittels Formaldehyd /169,266/ verliert das Thrombin seine spezifische proteolytische Wirkung auf Fibrinogen, während die esterspaltende

Aktivität gegenüber synthetischen Substraten wie TAME erhalten bleibt. Dieses Thrombin wurde Esterase-Thrombin (Thrombin E) genannt /123/.

Infolge der chemischen Umsetzung liegt hier nur die "unspezifische Wirkgruppe" des aktiven Zentrums des Thrombinmoleküls und nicht die "spezifischen Haftstellen" für die Fixierung bestimmter Reste des Subtrates in funktionsfähiger Form vor /157,156/ (vgl. dazu Kapitel 2.1.3.1.3).

Hirudin zeigte keine Affinität zum Esterase-Thrombin, wodurch dokumentiert werden konnte, daß die hydrolytisch aktiven Gruppen für die Bindung des Hirudins an Thrombin keine wesentliche Bedeutung haben /266/.

b) Hirudin und DIP-Thrombin

DIP-Thrombin entsteht durch die Reaktion des Enzyms mit Diisopropylfluorphosphat (DFP), einer organischen Phosphorverbindung. Durch die Phosphorylierung des Serin-OH im reaktiven Zentrum des Thrombins erlischt sowohl dessen proteolytische als auch esterolytische Aktivität /66,174,169/. Die quantitative Wechselwirkung zwischen DFP und Thrombin ist stark abhängig vom pH-Wert des Milieus. Maximale Umsatzraten wurden bei pH-Werten zwischen 8,0 und 10,0 erreicht /174/.

Markwardt und Walsmann /169,266/ untersuchten die Wechselwirkung des Hirudins mit DIP-Thrombin. Es stellte sich heraus, daß einerseits dieses katalytisch inaktive Thrombin die gleiche uneingeschränkte Bindungsfähigkeit für Hirudin wie natives Thrombin besitzt, während andererseits Hirudin (wie auch das synthetische Substrat TAME) das native Enzym vor der Inaktivierung durch DFP schützen. Diese Schutzfunktion des Hirudins wurde auf eine Abschirmung des katalytisch aktiven Bereiches des Enzyms im Komplex mit Hirudin zurückgeführt, da die Haftstellen des Hirudins offensicht-

lich nicht mit den Bindungsstellen des DFP im Thrombinmolekül identisch sind (s.o.). Hirudin wird primär an für die Substratspezifität verantwortliche Gruppierung gebunden, während DFP mit der "unspezifischen Wirkgruppe" des aktiven Zentrums reagiert und infolgedessen primär die gerinnungsaktive sowie esterolytische Wirkung des Enzyms hemmt /266, 139/.

c) Hirudin und Thrombin, das mittels 4-Amidinobenzolsulfofluorid und 4-(2-Aminoäthyl)-benzolsulfofluorid inaktiviert wurde.

4-Amidino- und 4-(2-Aminoäthyl)-benzolsulfofluorid sind synthetische Inhibitoren mit irreversibler Hemmwirkung auf Serinproteasen. Sie bilden mit Thrombin eine im physiologischen pH-Bereich stabile Enzym-Inhibitor-Verbindung /269/.

Der Nachweis, daß die irreversible Inaktivierung des Thrombins durch Benzamidin (ein synthetischer Inhibitor, der die Aktivität einiger Serinproteasen kompetitiv durch Bindung an das aktive Zentrum hemmt) verhindert werden konnte, deuten auf eine Reaktion des 4-Amidino- und 4-(2-Aminoäthyl)-benzolsulfofluorids mit Gruppierungen im aktiven Zentrum des Enzyms hin.

Da die Reaktivität des Hirudins mit 4-Amidinobenzolsulfonyl- und 4-(2-Aminoäthyl)-benzolsulfonyl-Thrombin erhalten blieb, wurde angenommen, daß diese Hemmstoffe analog dem DFP das katalytisch wirksame Zentrum bzw. die "unspezifische Wirkgruppe" blockieren /269/ (vgl. Kapitel 2.1.3.1.3).

d) Hirudin und der Thrombin-Proflavin-Komplex

Der Farbstoff Proflavin hemmt wie Hirudin die Thrombinwirkung auf Fibrinogen, allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß. Proflavin konkurriert mit dem Fibrinogen um sub-

stratbindende Haftstellen im Thrombinmolekül. Hirudin ist in der Lage, Proflavin aus der Komplexbildung mit Thrombin zu verdrängen, d.h. es konkurriert mit Proflavin um dessen Bindungsstellen im Thrombinmolekül /115/.

2.1.3.1.3 Hemmechanismus - das reaktive Zentrum

Wie in den vorangegangenen Ausführungen bereits mehrfach angedeutet, wird das aktive Zentrum der Proteinase Thrombin in verschiedene Funktions- und Bindungsbereiche unterteilt. Ein Bereich ist für die Spezifität und Fixierung des Substrates verantwortlich. Er besteht aus mehreren funktionellen Gruppen, die als spezifische Haftstellen für Teile des Substrates fungieren. Den zweiten Bereich bildet die sog. "unspezifische Wirkgruppe". Dieser stellt den katalytisch wirksamen Teil dar und bewirkt die Spaltung der hydrolysierbaren Peptid- und Esterbindungen /266,139,17/.

Bei der Thrombin-Hirudin-Interaktion besetzt der Inhibitor die aktive Enzymoberfläche; die enzymatische Aktivität des Thrombins wird dadurch aufgehoben. Als Hirudin-Haftstellen wurden die kationischen Gruppen des aktiven Zentrums des Enzyms ermittelt, die auch das Fibrinopeptid des spezifischen Substrates Fibrinogen binden /157/.

Aus den Untersuchungen mit chemisch modifiziertem Thrombin ging hervor, daß der katalytisch aktive Bereich des Thrombins im Komplex mit Hirudin zwar abgeschirmt, jedoch für die Bindung des Inhibitors an das Enzym vermutlich unbedeutend ist /266,268/. Hier unterscheidet sich das Hirudin von anderen natürlichen Protein-Proteinase-Inhibitoren, die mit dem reaktiven Serin des aktiven Zentrums in Wechselwirkung treten /17/.

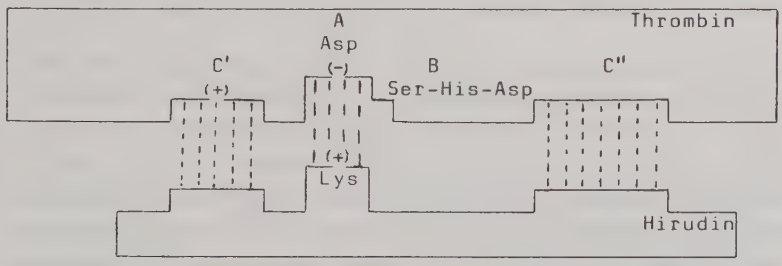
Untersuchungen von Laskowski Jr. et al. /128,127,129/ erga-

ben, daß verschiedene Protein-Proteinase-Inhibitoren in Analogie zum aktiven Zentrum der Enzyme ein sog. reaktives Zentrum aufweisen. Detaillierte Kenntnisse über das reaktive Zentrum des Hirudinmoleküls liegen noch nicht vor. Bei der Analyse seiner Aminosäuresequenz im Hinblick auf strukturelle Homologien zu anderen Proteinen stellten Petersen et al. /198/ fest, daß im Hirudinmolekül der Bereich Val 40, Thr 41, Glu 43, Pro 46 und Lys 47 als Bindungsstelle für Thrombin in Frage kommt oder zumindest an der Bindung des Enzyms beteiligt ist. Ebenso fanden Landis et al. /125/ bei ihren Studien über die Inaktivierung des Alpha-Thrombins durch Hirudin eine Bindungsaffinität im Hirudinsegment Thr 45 - Pro 46 - Lys 47 - Pro 48 für das Enzym.

Seitenketten-Interaktionen sowie die sterische Anordnung spielen bei der Determinierung der spezifischen Enzym-Substrat- bzw. Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle /17/. Beispielsweise zeigt sich die Seitenkettenspezifität der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen, zu denen auch Thrombin gehört, in der Affinität dieser Enzyme gegenüber basischen Aminosäuren; diese Proteinasen spalten nur Peptidbindungen, an denen die Carboxylgruppe eines Lysin- oder Argininrestes beteiligt ist /157,17/. Diese Spezifität der Enzyme wird durch charakteristische Strukturmerkmale in ihren Substrathaftzentren, den primären Bindungsstellen, festgelegt. Der primäre Bindungsbereich besteht aus einer hydrophoben Tasche in der Enzymoberfläche und der am Ende der Tasche lokalisierten und dissoziierten Carboxylgruppe (negativ geladen) der Asparaginsäure 189-Seitenkette /157/; letztere tritt bei der Bindung des Substrataminosäurerestes mit dessen positiv geladener Amino- bzw. Guanidinogruppe in intensive Wechselwirkung.

In Abbildung 10 werden die von Walsmann et al. /268/ postulierten Thrombin-Hirudin-Bindungsstellen in Anlehnung an die Illustration der Thrombin-Fibrinogen-Haftstellen nach Lorand /139/ schematisch dargestellt.

Abb. 10: Schema der Thrombin-Hirudin-Bindung nach Walsmann et al. /268/



A = primärer Bindungsbereich
Bindungsart: Ionenbeziehung, Wasserstoffbindung, hydrophobe Wechselwirkungen.
Reaktionspartner ist vermutlich die Seitenkette des Hirudin-Lysinrestes in Pos. 47.

B = katalytisch wirksame Gruppierung im Enzym
Bindungsart: Intermediäre Bildung einer kovalenten Bindung mit Substraten; Wechselwirkung mit Hirudin unwahrscheinlich.

C = sekundäre Bindungsbereiche

C' = mögliche Wechselwirkungen mit aromatischen oder aliphatischen Resten.
Bindungsart: Hydrophobe Wechselwirkungen; Wechselwirkung mit Hirudin wahrscheinlich.

C" = Proteinspezifitätsbereich
Bindungsart: Wasserstoffbindungen, Ionenbeziehungen; für Bindung von Fibrinogen und Hirudin essentiell.

2.1.3.1.4 Hirudineffekt auf thrombininduzierte Reaktionen im Gerinnungsablauf

Unter physiologischen Bedingungen katalysiert bzw. fördert die Serinprotease Thrombin mehrere Aktivierunsprozesse innerhalb der Gerinnungskaskade. Zur besseren Veranschaulichung des Hirudineinflusses auf die einzelnen thrombininduzierten Vorgänge werden diese im folgenden kurz erörtert.

a) Hirudineffekt auf die thrombinkatalysierte Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin

Thrombin, das Reaktionsprodukt der extrinsic und intrinsic Gerinnungskaskade, katalysiert in einer weiteren Gerinnungsphase die limitierte Proteolyse von Fibrinogen (F I), der löslichen Vorstufe des gerinnselbildenden Proteins Fibrin. Durch spezifische Hydrolyse von 4 Arg-Gly- und 2 Arg-Val-Bindungen pro Fibrinogenmolekül /107/ werden die Fibrinopeptide A und B freigesetzt und das Fibrinogen in ein Fibrinmonomer umgewandelt. Im physiologischen Milieu ist die Löslichkeit der Fibrinmonomere deutlich herabgesetzt, es kommt zur Polymerisation und Bildung eines Fibringels /139,30/.

Hirudin verhindert die Reaktion des Thrombins mit seinem spezifischen Substrat, dem Fibrinogen. Durch die Komplexbildung mit Hirudin wird die enzymatische Aktivität des Thrombins vollständig blockiert, die Umformung des Fibrinogens in Fibrin findet nicht statt /155/.

b) Einfluß des Hirudins auf die thrombininduzierte Aktivierung des Faktor XIII

Außer der Fibrinogenumwandlung in Fibrin aktiviert Thrombin in Gegenwart von Ca^{++} den fibrinstabilisierenden Faktor, FSF oder Faktor XIII. In Anwesenheit des Inhibitors Hirudin findet dieser Aktivierungsprozeß nicht statt /139,268/.

Faktor XIII katalysiert in aktivierter Form (Faktor XIIIa) als Transamidase die Vernetzung der aus Fibrinmonomeren gebildeten Polymere. Die polymerisationsfähigen Fibrinmonomere lagern sich durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken etc. zusammen. Dieses Fibrinmonomer-Aggregat kann durch geeignete Reagenzien wieder dissoziiert werden. Erst wenn Faktor XIIIa als Transamidase die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen den Fibrinmonomeren katalysiert, entsteht ein stabiles Polymerisationsprodukt. Diese Stabilisierung des

Fibrinnetzwerkes durch kovalente Quervernetzung ist für den Wundverschluß unerläßlich /139/.

c) Einfluß des Hirudins auf die thrombininduzierte Aktivierung des Faktor VIII

Der Plasma-Faktor VIII (antihämophiles Globulin) zeichnet sich durch eine die Gerinnung sowie die Plättchenaggregation fördernde Aktivität aus. Davie et al. (1979) /30/ bestätigten anhand vieler Versuche mit reinem Faktor VIII diese Eigenschaften. Rapaport et al. (1965) /203,196/ stellten fest, daß Thrombin eine deutliche Zunahme der gerinnungsfördenden Aktivität des Faktor VIII bewirkt. Zusammen mit Faktor IXa, Ca^{++} und Phospholipiden ist Faktor VIII (im "intrinsic system") an der Aktivierung des Faktor X zu Xa beteiligt /30/.

Österud et al. (1971) /196/ zeigten, daß bei Anwendung von nativem Faktor VIII nur relativ geringe Mengen an Faktor Xa nach 15 min gebildet waren, während nach vorheriger Inkubation von Faktor VIII mit Thrombin binnen 10 sec eine starke Aktivatoraktivität (Faktor Xa) nachgewiesen werden konnte. Pittlick et al. (1969) /200/ und Brown et al. (1979) /20/ hingegen vertreten aufgrund ihrer Ergebnisse die Ansicht, daß der durch Thrombin aktivierte Faktor VIII lediglich den Umwandlungsprozeß von Faktor X zu Xa um das 10-20fache beschleunigt, jedoch die insgesamt gebildete Menge an Faktor Xa nicht oder nur minimal beeinflußt.

Österud et al. (1971) /196/, Rick und Hoyer (1977) /204/ und Neal und Charvin (1979) /186,187/ beobachteten einen Hemmeffekt des Hirudins auf die Aktivierung von Faktor X nur bei Anwesenheit des Faktor VIII im Reaktionsgemisch (Faktor IXa, Faktor VIII, Ca^{++}, Phospholipid) und bestätigten damit Thrombin als physiologischen Aktivator des Faktor VIII. Dagegen beschrieben Pittlick et al. /200/ und Davie et al. /30/ auch eine inhibitorische Wirkung des Hirudin gegen

Faktor IXa (siehe auch 2.1.3.3). Neal und Charvin führten die nicht übereinstimmenden Resultate der beiden Arbeitsgruppen auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurück, u.a. auf die Verwendung verschiedener Aktivatoren /186/.

Triantaphyllopoulos (1979) /256/ demonstrierte, daß die Faktor VIII-Aktivität in Faktor IX- und Faktor X-Mangelplasmen in Gegenwart von Hirudin durch Blockierung des Thrombins ebenfalls komplett unterdrückt wurde.

d) Hirudineffekt auf die Thrombokinasebildung (Plasmathromboplastin)

Seegers et al. (1964) /22,286/ ermittelten, daß Thrombin eine beschleunigende Wirkung auf die Prothrombinaktivierung ausübt und beispielsweise 0,03 U/ml Thrombin die Gerinnungszeit erheblich verkürzen.

Markwardt (1963) /155/ sowie Caldwell (1967) /22/ berichten, daß die Bildung des Prothrombinaktivators (Thrombokinase) verzögert war, wenn das System Hirudin enthielt: 0,1-1 AT-E Hirudin/ml verzögerten die Thrombokinasebildung um mehrere Minuten, während die Gesamtmenge der gebildeten Thrombokinase unverändert blieb /155/. Bei einem mit Ca^{++} und Lipid vorinkubierten adsorbierten Plasma war der inhibitorische Effekt deutlich abgeschwächt, eine vergleichbare Hemmwirkung (s.o.) wurde dann erst bei wesentlich höheren Hirudinkonzentrationen erreicht /22/.

Auch im Thrombinbildungstest nach Pitney und Davie verursachten geringe Inhibitormengen eine Verzögerung der Thrombinbildung /155/.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß bereits geringe Hemmstoffkonzentrationen die Geschwindigkeit der Thrombokinase- und Thrombinbildung herabsetzen.

e) Einfluß des Hirudins auf die thrombininduzierte Aktivierung des Faktor VII und Faktor V

Thrombin und Faktor Xa sind neben anderen Serinproteasen an der Aktivierung von Faktor VII /30,202/ und Faktor V (Proaccelerin) /151/ beteiligt. Andererseits ist Faktor VIIa bei der Aktivierung des Faktor X ("extrinsic system") und Faktor Va bei der Prothrombinumwandlung in Thrombin involviert. Faktor Va ist keine Protease, er zählt zu den Hilfsproteinen mit Eigenschaften eines (Pro)Accelerators /109/.

Die Proaccelerin-aktivierende Wirkung des Thrombins wurde durch Zusatz größerer Mengen an Hirudin gehemmt. Äquivalente Inhibitormengen verhinderten dagegen die Thrombinwirkung auf Faktor V nicht. Offenbar genügen geringste Thrombinmengen, wie sie z.B. durch die Dissoziation des Hirudin-Thrombin-Komplexes (wenn dieser in sehr geringer Konzentration und ohne Hirudinüberschuß vorliegt) freiwerden können, um Faktor V zu aktivieren /151,153/.

f) Einfluß des Hirudins auf thrombininduzierte Thrombozytenreaktionen

Thrombozyten, die kernfreien Blutzellen, spielen bei der Hämostase und Thrombosierung eine wesentliche Rolle. Diverse physiologische Agenzien wie Thrombin, Kollagen und ADP induzieren morphologische und biochemische Veränderungen in den Blutplättchen, die letztlich zu deren Aggregation und zur Kontraktion der Agglomerate führen /31,103/.

Thrombin stimuliert die Freisetzung wichtiger Mediatoren aus den Thrombozyten und fördert auch die Plättchenaggregation. Markwardt stellte bereits 1958 /151,154,153/ eine hemmende Wirkung des Hirudins auf die Thrombozytenagglutination fest. In Suspensionen von gewaschenen Thrombozyten beobachtete er bei Zugabe von 10 NIH-E Thrombin/ml nach 20-30 sec eine Plättchenaggregation, die bei ausreichender Neutralisation

des Thrombins mittels Hirudin während einer 2-stündigen Beobachtungszeit ausblieb /155/.

Der Mechanismus, der den Thrombin-induzierten Veränderungen der Blutplättchen zugrunde liegt, ist noch nicht im Detail bekannt /31/. Einige Autoren berichten über ein thrombinlabiles Enzym, das sich in oder an der Thrombozytenoberfläche befinden soll /65/. Eindeutig belegt ist, daß isolierte Plättchenmembranen, ebenso wie intakte Thrombozyten, Thrombin binden. Dafür sind spezifische Rezeptoren für Thrombin in den Membranen verantwortlich, wie mit radioaktiv markiertem Enzym nachgewiesen werden konnte. Diese Thrombinbindung allein reicht allerdings nicht aus, um eine Agglutination der Plättchen zu provozieren.

Die Blutplättchen enthalten eine große Menge an Ca^{++}, die nicht mit extrazellulärem Ca^{++} in einem einfachen Diffusionsaustausch steht. Von großer Bedeutung für den Ablauf des Gerinnungsvorganges ist, daß Thrombin die Freisetzung von bis zu ca. 76% des intrazellulären Ca^{++}-Pools der Thrombozyten induzieren kann. Wird Hirudin den Plättchen vor dem Thrombin zugesetzt, so wird die Ca^{++}-Freisetzung vollständig gehemmt /31/.

Chao (1976) /25/ fand bei vergleichenden Untersuchungen von Suspensionen gewaschener Blutplättchen und inerter Partikel, daß die thrombininduzierte Freisetzung von ADP aus Thrombozyten die erste Phase der Blutplättchenaggregation anzeigt und daß die zweite (irreversible) Phase das Ergebnis einer Interaktion zwischen thrombinexponierten Plättchen und polymerisierendem Fibrin sei. Hirudinzugabe zu der polymerisierenden Fibrinlösung vor dem Hinzufügen der Blutplättchensuspension verhinderte die Aggregation. Weitere Studien zeigten, daß der Inhibitor die Thrombinwirksamkeit gegenüber Thrombozyten eindeutig hemmen kann /25/.

Hirudin hemmt auch nahezu vollständig die Bindung von Thrombin an die Thrombozyten. Es liegt demnach eine kausale

Beziehung zwischen der Thrombinbindung und der Freisetzungsreaktion dieser Zellen vor /65/.

Im Kapitel 2.1.4.3.6 wird im Zusammenhang mit der labordiagnostischen Anwendung des Hirudins der Einfluß des Inhibitors auf weitere Thrombozytenreaktionen beschrieben.

g) Einfluß des Hirudins auf die fibrinolytische Aktivität des Thrombins

Triantaphyllopoulos und Kang (1977) /257,107/ wiesen eine fibrinolytische Aktivität des Thrombins nach. Ihre Versuche führten sie mit plasminogenfreiem Human-Thrombin durch, das zunächst das Fibrinogen koagulierte und anschließend die gebildeten Gerinnsel wieder auflöste.

Diese Fibrinolyse wurde durch Hirudinzugabe vollständig blockiert. Der Beweis, daß Thrombin und nicht Plasmin für den Abbau verantwortlich war, ergab sich aus dem Befund, daß Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor oder Aprotinin (Trasylol) in Kombination mit einem spezifischen Inhibitor der Plasminogenaktivierung (ε-Aminocapronsäure) diesen Reaktionsablauf, d.h. die proteolytische Spaltung nicht beeinflußten, während Hirudin den fibrinolytischen Prozeß hemmte /257/.

Je nach Fibrinolyse mittels Thrombin oder Plasmin wurden Unterschiede in den Elektrophorese-Mustern der Proteolyseprodukte des Fibrins und auch immunologische Differenzen in den Spaltprodukten verifiziert. Die Fibrinolyse durch Thrombin ist dem Abbau durch Plasmin ähnlich aber nicht identisch. Die Abbauprodukte verlängern die Thrombinzeit und hemmen den Prothrombinverbrauch sowie die Blutgerinnung /257/.

2.1.3.2 Hirudineffekt auf das Intermediat 2, ein Zwischenprodukt der Prothrombinaktivierung

Kisiel und Hanahan (1974) /111/ kamen bei ihren Studien über die Prothrombinaktivierung mit Faktor Xa in Gegenwart von Hirudin zu dem Ergebnis, daß Hirudin bereits auf eine inaktive Vorstufe des Thrombins, das sog. Intermediat 2, hemmend wirkt und mit diesem Zwischenprodukt einen elektrophoretisch nachweisbaren Komplex bildet, sowie seine Umwandlung durch Faktor Xa in Thrombin verhindert.

2.1.3.3 Inhibitorwirkung des Hirudins gegen Faktor IXa

Faktor IXa entsteht durch die Aktivierung von Faktor IX (Christmas factor, antihämophiles Globulin B) mittels Faktor XIa in Gegenwart von Ca^{++} in einer Zweistufenreaktion. Das Enzym besteht aus einer schweren (MG ca. 27 300) und einer leichten (MG ca. 16 600) Polypeptidkette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Das aktive Zentrum ist in der schweren Kette lokalisiert. Bei der Aktivierung des intrinsic Systems der Blutgerinnung bewirkt Faktor IXa zusammen mit aktiviertem Faktor VIII, Ca^{++} und Phospholipid die Umwandlung von Faktor X in seine aktive Form, Faktor Xa /30/.

Legaz und Davie /30/ schreiben dem Hirudin auch eine Hemmwirkung gegenüber Faktor IXa zu. Entsprechend wird die Aktivierung von Faktor X, d.h. seine enzymatische Wirksamkeit auf die Prothrombinaktivierung, durch Hirudin blockiert. Enzym (Faktor IXa) und Inhibitor bilden einen Komplex im molaren Verhältnis 1:1. Die Autoren stellten ebenfalls fest, daß Faktor IXa in Anwesenheit von Faktor VIII, Ca^{++} und Phospholipid jedoch gegen die Inhibitorwirkung des Hirudins geschützt ist /119/.

Brown et al. (1979) /20/ konnten bei ihren Versuchen einen hemmenden Effekt des Hirudins gegenüber humanem Faktor IXa nicht beobachten. In Anlehnung an die Ergebnisse von Suomela (1975) /245/, der multiple Formen des Faktor IX chromatographisch und durch isoelektrische Fokussierung nachwies, vermuteten die Autoren, daß der von ihnen verwendete Faktor IXa möglicherweise eine gegen den Inhibitor resistente Form darstellt.

2.1.3.4 Hirudineffekt auf die Thrombin-Antithrombin III-Reaktion

Walsmann (1960) /266/ ermittelte, daß Hirudin das Gerinnungsferment vor der irreversiblen Inaktivierung durch Antithrombin III schützt, da die Wirkung dieses physiologischen Inhibitors an frei zugängliche Bereiche des aktiven Zentrums des Thrombinmoleküls gebunden ist.

2.1.3.5 Einfluß des Hirudins auf Autoprothrombin C

Autoprothrombin C (APC) ist ein von Landaburu und Seegers (1962) /116/ beschriebenes Enzym, das neben Thrombin aus Prothrombin entsteht und zusammen mit Ca^{++}, Acceleratorglobulinen und Lipiden die Prothrombinumwandlung bewirkt. Hirudin hat keinen Einfluß auf die APC-Aktivität /22/.

2.1.3.6 Hirudineffekt auf nicht durch Faktor Xa aktivierte Thrombine

Morita et al. (1975) /179/ und Fulton et al. (1979) /62/ wandten zur Prothrombinaktivierung statt Faktor Xa und Co-

faktoren Proteinasen aus Schlangengift mit thrombinähnlicher Spezifität an. Ecarin, der Aktivator aus dem Gift der Echis carinatus Viper, bewirkt die Bildung eines enzymatisch aktiven Intermediates und eines Alpha-Thrombins mit geringerer Gerinnungsaktivität, jedoch starker esterolytischer Wirksamkeit.

Hirudin blockiert sowohl dieses Alpha-Thrombin als auch das aktive Zwischenprodukt /179,62,232/. Das mittels Ecarin gebildete Thrombin ist jedoch im Vergleich zum durch Faktor Xa aktivierten Enzym resistenter gegenüber Inhibitoren /62/.

2.1.4 Pharmakokinetische, pharmakodynamische u.a. Eigenschaften des Hirudins

2.1.4.1 Resorption, Ausscheidung, Clearance

Das Polypeptid Hirudin wird von den Verdauungsenzymen durch proteolytischen Abbau inaktiviert. Infolgedessen können ausreichende Konzentrationen im Blut nur bei parenteraler Zufuhr erreicht werden /151/. Nach intravenöser Injektion wird Hirudin verhältnismäßig schnell aus dem Blut eliminiert, die Halbwertszeit beträgt ca. 50-60 min /159/. Untersuchungen an gesunden Versuchspersonen ergaben, daß Hirudin 2 h nach i.v. Gabe von 20 000 AT-E im Blut nicht mehr nachweisbar war, während bei gleicher Inhibitormenge, i.m. appliziert, bis zu 5 h oder s.c. verabreicht, bis zu 8 h ein Blutspiegel aufgrund der verzögerten Resorption meßbar war /155/.

Die Hirudinkonzentration fällt in der Zirkulation innerhalb der ersten 10 min nach i.v. Injektion infolge Abdiffusion des Hemmstoffes in das Gewebe stark ab. Nach Teilrückresorp-

tion und anschließendem Konzentrationsausgleich zwischen intra- und extravasalem Flüssigkeitsraum, nimmt die Hirudinkonzentration im Blut mit einer Halbwertzeit von 60 min kontinuierlich ab. Nach s.c. Injektion wurde über längere Zeit ein niedriger Hirudinspiegel beobachtet /151,158/.

Schon Haycraft /85/ stellte 1884 bei seinen Versuchen mit Blutegelextrakten fest, daß die gerinnungshemmende Substanz nach relativ kurzer Wirkungsdauer im Tierorganismus mit dem Harn ausgeschieden wird. Entsprechende Ergebnisse von Bodong (1904) /18/ zeigten ebenfalls, daß kleine Hirudinmengen in unveränderter Form im Harn eliminiert werden.

Markwardt /157,151/ fand 70-80% des i.v., i.m. oder s.c. injizierten Hirudins in chemisch unveränderter Form im 24-Std. Urin von gesunden Versuchspersonen und von Tieren. Zum Nachweis des biologisch aktiven Hirudins wurden Harnproben gefriergetrocknet und papierelektrophoretisch aufgetrennt. Das zum Vergleich aufgetragene reine Hirudin unterschied sich im elektrophoretischen Verhalten nicht vom ausgeschiedenen Hemmstoff. Darüberhinaus konnte aus dem Harn mittels bekannter Isolierungsverfahren reines Hirudin mit einer dem Ausgangsprodukt entsprechenden spezifischen Hemmaktivität zurückgewonnen werden /151/.

Die renale Hirudin-Clearance wurde an 2,0-2,5 kg schweren Kaninchen nach i.v. Injektion von 10 000 AT-E ermittelt. Durch Bestimmung der Clearance-Ratio (Hirudin-Clearance/glomerulären Filtrationsvolumen = ca. 1 nach Erreichen des Diffusionsgleichgewichtes) ließ sich feststellen, daß Hirudin ausschließlich durch Filtration eliminiert wird. Als Maß für das Glomerulusfiltrat diente die Kreatininclearance. 90 min post injectionem waren bereits 80% des Hirudins über die Nieren ausgeschieden /151,158,159/.

2.1.4.2 Toxizität

Die Toxizität des reinen Hirudins wird als sehr gering eingestuft. Die früher häufiger erwähnten toxischen Nebenwirkungen werden auf Ballaststoffe in den Präparaten, vorwiegend Eiweißkörper und ihre Abbauprodukte zurückgeführt /63/. So ergab z.B. eine von Walsmann 1964 durchgeführte Prüfung verschiedener Handelspräparate eine Schwankung im Hirudingehalt zwischen 4 200 AT-E/mg und 0,6 AT-E/mg /267/.

Bei Gaben von 20 mg reinem Hirudin/kg i.v. an Kaninchen oder 1 g reinem Hirudin/kg i.p. an weißen Mäusen wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. Auch bei wiederholten Injektionen in Intervallen bis zu 3 Wochen traten keine Sensibilisierungszeichen auf /150,158/.

Messungen der Herz- und Atemfrequenz, des Druckes im rechten und linken Ventrikel sowie des mittleren arteriellen Druckes an Hunden bestätigten, daß 10 000 AT-E Hirudin/kg keine Alterationen im kardiovaskulären und pulmonalen System hervorrufen. Unreine Präparate hingegen von z.B. 4 000 AT-E/mg verursachten Herz- und Kreislaufdepressionen sowie eine Zunahme der Atemfrequenz. Nach 60 bis 90 min hatten sich die Werte wieder normalisiert /159/.

2.1.4.3 Anwendung des Hirudins für gerinnungsphysiologische und gerinnungsdiagnostische Studien

Besonders interessant war der natürliche Hemmstoff für biochemische Arbeiten über die Blutgerinnung sowie die klinische Blutgerinnungsdiagnostik.

Bis zur exakten chemischen Charakterisierung des Hirudins war die Grundlage des Bestimmungsverfahrens die biologische

Aktivität des Inhibitors /150/. Die im folgenden beschriebenen Bestimmungen des Hirudins, Thrombins sowie Prothrombins fanden aufgrund ihrer einfachen Handhabung häufige Anwendung im Gerinnungslabor /147,35/. Der Vorteil dieser Methoden ist, daß nicht die durch andere Faktoren beeinflußbare Gerinnungszeit, sondern eine Enzym- bzw. Inhibitormenge bestimmt wird /270/.

2.1.4.3.1 Bestimmungsmethode für Hirudin

Da die Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin nach stöchiometrischen Gesetzen abläuft, ist eine rasche quantitative Bestimmung der Reaktionspartner mittels Titration möglich.

Die von Markwardt entwickelte Methode der sog. Hirudintitration /145/ beruht auf folgendem Prinzip: (Zitat) "Eine mit Hirudin versetzte Fibrinogenlösung bleibt auf steigenden Zusatz von Thrombin so lange ungeronnen, bis alles Hirudin neutralisiert ist. Ein Überschuß an Thrombin macht sich innerhalb weniger Sekunden an der Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin bemerkbar. Die Gerinnung (Umschlagspunkt) des Fibrinogens (Indikator) benötigt Zeit, aus diesem Grund darf nicht ununterbrochen bis zum Umschlagspunkt titriert werden, sondern Thrombin wird in Zeitabständen von 1 min zugesetzt. Der Neutralpunkt (Titrationspunkt) ist erreicht, wenn die Fibrinogenlösung innerhalb 1 min geronnen ist." (Zitatende)

Die ermittelte Hirudinaktivität wird in Antithrombin-Einheiten (AT-E) angegeben. 1 AT-E ist die Menge Hirudin, die notwendig ist, um 1 NIH-E Thrombin in ihrer enzymatischen Aktivität auf Fibrinogen zu blockieren /145/.

2.1.4.3.2 Quantitative Bestimmung des Thrombins und Prothrombins

Die Aktivität des Gerinnungsfermentes wird in NIH-Einheiten (National Institutes of Health) angegeben. 1 NIH-E Thrombin ist die Menge Thrombin, die 1 ml einer standardisierten Fibrinogenlösung in 15 sec bei 28° C koaguliert oder 1 ml einer 1%igen Lösung einer Plasma-Fraktion I nach Cohn vom Menschen bei 25° C in 45 sec koaguliert /147/.

Die Anwendung des Hirudins als Testsubstanz bei der Thrombinbestimmung hat gegenüber der Bestimmungsmethode mit standardisierten Fibrinogenlösungen den Vorteil, daß die Enzymmenge direkt, und nicht über die von diversen Milieufaktoren beeinflußbare Gerinnungszeit ermittelt wird /150/.

Zur Bestimmung eines unbekannten Thrombinpräparates wird die standardisierte Testsubstanz (Hirudin) mit dem Indikator (Fibrinogen) gemischt und die neutralisierende Lösung (Thrombin) bis zum Umschlagspunkt des Indikators (Gerinnung) hinzugefügt /147/. Die Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin wird als "Hirudin-Neutralisation" bezeichnet /155/.

Die quantitative Prothrombinbestimmung beruht auf der biologischen Wirkung des Thrombins. Das frisch entnommene Blut wird mit Hirudin im Überschuß versetzt und durch Zugabe von Gewebsthrombokinase wird die vollständige Umwandlung des Prothrombins in Thrombin erreicht; letzteres wird durch den Inhibitor neutralisiert. Das überschüssige Hirudin wird anschließend bis zur Gerinnung der Blutprobe mittels eines standardisierten Thrombins zurücktitriert. Die Ermittlung des Prothrombingehaltes erfolgt durch Subtraktion der verbrauchten Thrombinmenge (=Menge des überschüssigen Hirudins) von der primär zugefügten Hirudinmenge. Die Prothrombinaktivität wird auch in NIH-E angegeben. 1 Einheit Prothrombin entspricht der Menge, die nach kompletter Aktivierung 1 Einheit Thrombin liefert /149,172/.

9,4 µg Hirudin inaktivieren den Thrombingehalt von 1 ml Blut nach dessen Freisetzung aus Prothrombin. Entsprechend wurde ein Prothrombingehalt des Normalbutes von 97,5 NIH-E/ml mit einer Standardabweichung von +/- 6,1 NIH-E pro ml ermittelt /270,172/.

Folgende Vorteile werden dem o.g. Verfahren gegenüber anderen Bestimmungen des Prothrombins oder der Prothrombinzeit (Thromboplastinzeit) eingeräumt:

a) zur Testdurchführung sind nur 0,2 ml Kapillarblut notwendig;
b) die Bestimmung erfolgt an Vollblut und der Gehalt wird in NIH-E angegeben;
c) die Titration kann 30 min bis 6 h nach der Blutentnahme durchgeführt werden;
d) die Methode ist gegen Thrombokinaseaktivität- und Temperaturschwankungen unempfindlich.

Der therapeutische Bereich des durch Hirudintitration ermittelte Prothrombinspiegels liegt zwischen 20 und 40 NIH-E pro ml. Der optimale Wert für einen regelmäßigen Therapieverlauf ist 30 NIH-E/ml /172/.

2.1.4.3.3 Der "Hirudintest": eine Methode zur Kontrolle der Prothrombinaktivität bei Antikoagulantientherapie

Der von Schmutzler und Markwardt (1962) /220/ entwickelte "Hirudintest" ist eine Mikromethode zur Überwachung des Prothrombinspiegels bei einer Antikoagulantientherapie vom Dicumarol- oder Indandion-Typ.

Die Methode stützt sich weitgehend auf die o.g. Vorgehensweise bei der "Hirudinneutralisation" und beruht auf folgendem Prinzip: Eine mit Hirudin versetzte Blutprobe neutralisiert die äquivalente Menge des aus dem Prothrombin gebilde-

ten Thrombins. Ist die hinzugefügte Hirudinmenge geringer, koaguliert die Lösung; liegt Hirudin im Überschuß vor, bleibt die Probe ungeronnen. Wird eine Blutprobe mit einer bekannten Hirudinmenge versetzt und durch Zugabe von Gewebsthrombokinase die komplette Umwandlung des Prothrombins in Thrombin erreicht, so läßt sich aus der Feststellung, ob diese Probe koaguliert oder nicht gerinnt, der Prothrombinspiegel abschätzen /220,172,270/.

Zur Kontrolle der Antikoagulantientherapie wurden zwei Hirudinkonzentrationen, die der oberen und unteren Grenze des therapeutisch wünschenswerten Prothrombinspiegels entsprachen, verwendet. Das mit dem Hirudintest ermittelte therapeutische Optimum des Prothrombinspiegels lag zwischen 25 und 40 NIH-E pro ml, was einer Prothrombinaktivität bei der Bestimmung nach Quick von 12-23% entspricht /172,220/.

Der Hirudintest liefert keine exakten Werte, sondern ermöglicht eine orientierende Aussage darüber, ob der Prothrombinspiegel zu stark oder zu wenig bzw. auf das erforderliche Niveau gesenkt wurde /270/.

Gabor et al. (1967) /64/ und Walsmann et al. (1970) /270/ verglichen zahlreiche bei Anwendung des Hirudintestes ermittelte Werte der Prothrombinaktivität mit denen, die mittels der Methode nach Quick und der Bestimmung der Recalcifizierungszeit gewonnen wurden unter Berücksichtigung der Behandlungsdauer, der Höhe der Dicumarol- bzw. Indandion-Dosierung sowie aufgetretener Blutungen oder Thrombosen. Walsmann et al. /270/ fanden in 76% der Fälle übereinstimmende Testergebnisse; bei 14% der Patienten erfolgte eine zu geringe Senkung des Prothrombinspiegels, gemessen mit dem Hirudintest, während die Quickwerte im therapeutischen Bereich lagen. Bei 10% der Probanden wurde eine zu starke Senkung des Prothrombinwertes (teilweise einhergehend mit Epistaxis und Mikrohämaturie) festgestellt, obwohl die Werte des Quicktestes sich wiederum im Normbereich befanden /270/.

Es wurde von den Autoren empfohlen, bei der Neueinstellung einer Antikoagulantienbehandlung sowie bei Korrekturen stärkerer Abweichungen vom optimalen therapeutischen Bereich den Quick-Test anzuwenden, da in diesen Fällen exakte quantitative Angaben unerläßlich sind, während für die weitere Therapiekontrolle generell der Hirudintest ausreichend sei /64, 270/.

2.1.4.3.4 Hirudintoleranztest

Der Hirudintoleranztest stellt ebenfalls ein von Markwardt (1959) /152/ entwickeltes einfaches und orientierendes Untersuchungsverfahren zur Erfassung von Störungen im Gerinnungsablauf dar, das sich insbesondere zur Kontrolle von Gerinnungsvorgängen eignet, die zur Prothrombinaktivierung führen.

Die "Hirudintoleranz" einer Blutprobe ist definiert als die Empfindlichkeit dieser Blutprobe gegenüber der gerinnungshemmenden Aktivität des Hirudins entsprechend ihrer Fähigkeit zur Thrombinbildung. Die Hirudintoleranz bietet eine Orientierung, ob eine gesteigerte oder verminderte Gerinnungstendenz vorliegt. Sie wird durch Ermittlung der Recalcifizierungszeit eines hirudinisierten Citratblutes bestimmt. Die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung entspricht der Hirudintoleranzzeit. Durch die Verzögerung des Gerinnungsvorganges in Gegenwart von Hirudin kommen Störungen bei der Thrombinbildung besonders deutlich zum Ausdruck /152/.

Die von Markwardt gemessene Hirudintoleranzzeit lag im Mittel bei 153 sec mit einer Standardabweichung von 18 sec. Bei der Durchführung des Tests wurde die zu untersuchende citrierte Blutprobe mit einer bekannten Menge Hirudin versetzt, die eine äquivalente Menge Thrombin neutralisiert. Erst wenn das gesamte Hirudin verbraucht bzw. gebunden ist,

entfaltet jedes weitere gebildete Thrombinmolekül seine enzymatische Aktivität und löst die Fibrinbildung aus /152/.

Wenzel (1960) /272/ bestätigte in einer klinischen Studie über die Diagnostik hämorrhagischer Diathesen und Kontrolle der Antikoagulantientherapie die Ergebnisse von Markwardt. Es zeigte sich, daß die Hirudintitration zur Bestimmung des Prothrombins bei Antikoagulantientherapie und der Hirudintoleranztest zur Ermittlung von Gerinnungsstörungen wie Hämophilien, essentielle oder symptomatische Thrombopenien und bei Hepatopathien zuverlässige, im Vergleich zu anderen üblichen Verfahren einfach zu handhabende und für die Routinediagnostik geeignete Methoden darstellen.

Auch Besel (1967) /15/ kam durch eine vergleichende Untersuchung von 4 Toleranztests (Heparin-, Protamin-, Kochsalz- und Hirudin-Toleranztest) zu dem Resultat, daß der Hirudintoleranztest bei Thrombopenien, Hämophilie und Antikoagulantientherapie den anderen Methoden überlegen ist.

Rickers (1966) /206/ untersuchte die Bedeutung des Hirudintoleranztests für die Differenzierung von Hämostasestörungen in der Pädiatrie. Mit Hilfe dieses Tests wurden zunächst Störungen im Gerinnungsablauf erkannt und differentialdiagnostisch in Koagulopathien, Thrombozytopenien, Vasopathien oder symptomatische Blutungen grob abgegrenzt. Eine deutliche Verlängerung der Hirudintoleranzzeit lag bei der Hämophilie und bei Thrombozytopenien vor, obwohl bei den letzteren z.T. recht unterschiedliche Zeitwerte ermittelt wurden. Bei gefäßbedingten hämorrhagischen Diathesen oder symptomatischen Blutungen wurden normale Hirudintoleranzzeiten gefunden /206/. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Teichler (1965) /251/ in einer klinischen Studie über die Diagnostik hämorrhagischer Diathesen.

Bekannt ist, daß Operationstraumen eine Aktivierung des Gerinnungssystems auslösen. Postoperativ kommt es zunächst zu einer Verminderung der hepatogenen Prokoagulationsfakto-

ren, die eine kompensatorische Hyperkoagulabilität zur Folge hat und u.a. mit einem erhöhten Fibrinogenspiegel, Thrombozytose und Plättchenfunktionsstörungen einhergeht. Bei unkompliziertem Genesungsverlauf erreichen die Gerinnungsfaktoren nach wenigen Tagen wieder ihre Ausgangswerte /262, 285/.

Woziwodzi (1969) /275/ verfolgte die Hirudintoleranzzeit vor und nach verschiedenen operativen Eingriffen wie Strumaresektionen, Cholecystektomien, Operationen an den Gallenwegen, Magenresektionen und thoraxchirurgischen Operationen. Bei der Bewertung der Ergebnisse wurde die Grundkrankheit der Probanden und das Ausmaß der Operation berücksichtigt. In allen Gruppen fand sich die stärkste Gerinnungszeitverkürzung unmittelbar nach dem Eingriff und während der ersten postoperativen Tage.

Wamhoff (1974) /271/ bestimmte mittels des Hirudintoleranzassays die Aktivität von Thrombozyten-Faktor 3 im Plasma. Dieser Faktor, ein Lipoprotein der Thrombozytenmembran, fördert die Thrombinbildung und somit den Gerinnungsvorgang. Die Plättchen 3-Aktivität drückt sich aus in einer Verkürzung der Recalcifizierungszeit in Gegenwart von Hirudin im thrombozytenreichen gegenüber dem plättchenarmen Plasma. Der mit Vollblut durchgeführte Test zeigte erst bei Thrombozytenwerten unter 30 000/µl eine pathologische Verzögerung. Dies wurde auf eine Faktor 3-ähnliche Aktivität in den Erythrozyten zurückgeführt.

2.1.4.3.5 Aktivitätsbestimmung des Thrombins mit chromogenen Substraten

Die synthetischen chromogenen Substrate sind zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen in Systemen, die Proteasen enthalten, bilden (z.B. durch Aktivierung von Proenzymen) oder verbrau-

chen, gut geeignet. Inhibitoren können ebenfalls, ausgehend von bekannten Enzymmengen, anhand der Aktivitätsabnahme bestimmt werden. Die Anwendung der synthetischen chromogenen Substrate gewinnt dafür zunehmend an Bedeutung /249/.

Für die Aktivitätsbestimmung der Proteasen weisen die synthetischen chromogenen Peptidsubstrate gegenüber den natürlichen Substraten einige Vorteile auf. Die Beschaffung von homogenen natürlichen Substraten ist schwierig, oft können nur partiell gereinigte oder rohe Präparate verwendet werden, deren Verunreinigungen die Ergebnisse beeinflussen. Die Bestimmung und Standardisierung von Enzymen mittels der chromogenen Substrate ist unproblematischer. Sie sind stabile, qualitativ und quantitativ einheitliche Substanzen; ihre Spaltung kann durch einfache photometrische Methoden verfolgt werden. Die Empfindlichkeit dieser Substrate ist im allgemeinen hoch, andererseits können sie jedoch nicht exakt die Eigenschaften eines hochmolekularen natürlichen Substrates wiedergeben /27,249,175,242/.

Bei Enzymen mit breiter Substratspezifität läßt sich die Spezifität eines synthetischen Peptidsubstrates durch Anwendung von Inhibitoren zur Ausschaltung fremder Enzymaktivitäten erhöhen. Wird beispielsweise bei der Prothrombinbestimmung das natürliche Substrat Fibrinogen durch Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.HCl ersetzt und das störende Plasmin und Plasma-Kallikrein durch Aprotininzusatz blockiert, so werden zuverlässige Plasma-Prothrombinspiegel erhalten /248,249,231,191, 242,247/.

Die Spaltung synthetischer Peptidsubstrate reflektiert die biologische Funktion eines Enzyms eindeutiger als die Spaltung von Estersubstraten /248/, da die amidolytische Abspaltung der chromogenen Gruppe zur proteolytischen Aktivität des Enzyms parallel verläuft /249/. Die amidolytische Aktivität des Thrombins wird wie seine proteolytische Aktivität durch Hirudin gehemmt /45,120/.

Die Proteasen spalten aus den farblosen chromogenen Substratverbindungen die chromogene Gruppe ab; diese Reaktion wird durch eine gut meßbare Verfärbung des Reaktionsgemisches dokumentiert. Das Ausmaß der Freisetzung des gefärbten Reaktionsproduktes ist direkt proportional zur Enzymaktivität /249/.

1 Internationale Einheit (U) ist die Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro min umsetzt. Eine Internationle Inhibitoreinheit (IU) ist die Inhibitormenge, die eine Enzymeinheit zu hemmen vermag /249/.

2.1.4.3.6 Anwendung des Hirudins zum Studium einiger Thrombozytenreaktionen

Die Thrombozyten spielen bei der Hämostase, und zwar sowohl bei der Erhaltung der normalen Gefäßintegrität als auch bei der Blutstillung eine essentielle Rolle /93/. Hirudin hat sich als Antikoagulans für Untersuchungen von Thrombozytenfunktionen bewährt, da es die Thrombozyten selbst nicht beeinflußt und die Beobachtung der Blutplättchenreaktionen bei physiologischen Ca^{++}-Konzentrationen ermöglicht /67/.

Hirudin hemmt die stimulierende Wirkung des Thrombins auf Blutplättchen und verhindert die Bindung des Alpha-Thrombins an die absättigbaren, nicht aber an die nicht absättigbaren Rezeptoren der Thrombozyten. Das Hinzufügen von Hirudin zum Thrombin-Thrombozyten-Gemisch führte zu einer biphasischen Dissoziation der Thrombin-Zellbindung /250,65/.

Ganguly und Sonnichsen (1976) /65) berichteten in ihrer Studie über die Bindung des Thrombins an Blutplättchen, daß Human-Thrombozyten spezifische, an der Plättchenmembran lokalisierte Rezeptoren für Thrombin besitzen. Der Beweis für die Lokalisation der Bindungsstellen an der Thrombozyten-

oberfläche ergab sich aus der Tatsache, daß isolierte Blutplättchenmembranen Thrombin wie die intakten Thrombozyten binden. Die Affinität und Anzahl der Bindungen ist von der Thrombinkonzentration abhängig. Biochemische und immunologische Untersuchungen zeigten, daß der Thrombinrezeptor mit dem kontraktilen Protein Thrombosthenin der Blutplättchen eng verbunden ist. Durch die Bindung von Thrombin an die Thrombozyten werden diese zwar stimuliert, sie reicht jedoch nach Ansicht einiger Autoren zur Aggregation der Plättchen nicht aus. Es wird vermutet, daß hier noch andere Vorgänge beteiligt sind /65/.

Im plättchenreichen Citratplasma induzieren ADP /94/, Adrenalin /67/ und Kollagen /94/ die biphasische Thrombozytenaggregation bei gleichzeitiger Serotoninfreigabe (Hydroxy-Tryptamin).

Glusa und Markwardt (1980) /67/ untersuchten die adrenerge Reaktion von Human-Thrombozyten im hirudinisierten Plasma. Sie beobachteten im plättchenreichen Hirudinplasma nur eine sehr schwache primäre und keine sekundäre Aggregation, auch nach Erhöhung der Adrenalinkonzentration auf das 10-fache. Hingegen stimulierte Adrenalin sowohl im hirudinisierten als auch im inhibitorfreien Citratplasma die biphasische Aggregation. Diese unterschiedliche Agglutinationsneigung wurde auf verschiedene Ca^{++}-Konzentrationen in den Plasmen zurückgeführt, und infolgedessen als Ursache der adrenalininduzierten sekundären Thrombozytenaggregation nicht die Thrombinwirkung, sondern die Reduktion der Ca^{++} durch Citrat angesehen.

Solum (1965) /237/, Seegers et al. (1970) /226/, Chao et al. (1976) /25/, Mustard et al. (1975) /184/ und Macfarlane et al. (1975) /141/ untersuchten die ADP-induzierte Freisetzungsreaktion und Thrombozytenaggregation. Im plättchenreichen Citratplasma verhinderte Hirudin diese Reaktionen nicht, demzufolge wurde dem Thrombin auch bei diesen Reaktionen nur eine untergeordnete Rolle zugeschrieben.

Lagarde et al. (1980) /121/ beobachteten bei der Ausarbeitung einer einfachen Methode zur Isolierung der Thrombozyten aus Plasma, daß Hirudin die durch geringe Kollagenmengen stimulierte Blutplättchenagglomeration nicht hemmt.

Huzoor-Akbar und Ardlie (1978) /94,93/ postulierten hingegen, daß Thrombin der primäre Mediator der durch ADP, Epinephrin und Kollagen induzierten biphasischen Thrombozytenaggregation sowie Freisetzungsreaktionen sei, die nach ihren Erfahrungen von Hirudin blockiert wurden. Im Citratblut beobachteten die Autoren allerdings auch keinen Inhibitoreffekt des Hirudins.

Van Wijk et al. (1979) /273/ stellten fest, daß in einem Gemisch von gewaschenen Human-Thrombozyten, Ca^{++} und den reinen Faktoren X und II ausreichende Thrombinmengen gebildet werden, um eine Plättchenagglutination hervorzurufen.

Dieses Thrombin entsteht infolge der Aktivierung von Faktor X durch die Blutplättchen. Sowohl Hirudin als auch der Faktor Xa-Inhibitor SBTI verhinderten eine Aggregation der Thrombozyten.

Tumorzellen in Suspensionen können die Blutplättchenaggregation fördern. Es ist bekannt, daß eine häufige Komplikation verschiedener Malignomarten Thromboembolien sind. Holme et al. (1978) /92/ zeigten, daß die ADP-induzierte Interaktion zwischen Tumorzellen und Plättchen mit einer möglichen zusätzlichen Gerinnungsaktivität einhergeht. Die Beteiligung des Thrombins an dieser Reaktion im thrombozytenreichen Plasma nach Zusatz von verschiedenen Tumorzelltypen war offensichtlich unbedeutend, da Hirudin keinen inhibitorischen Effekt auf die Aggregationsreaktion ausübte.

2.1.4.3.7 Anwendung des Hirudins für spezielle Untersuchungen

a) Thrombin beeinflußt das Zellwachstum und die Zellmorphologie von menschlichen Fibroblasten der Haut. Diese thrombininduzierten Effekte sind reversibel und können durch vorherigen Hirudinzusatz vermieden werden. Hall und Ganguly (1980) /79/ untersuchten in Zellkulturen den stimulierenden oder hemmenden Einfluß des Thrombins auf die Zellproliferation und -morphologie. Sie stellten fest, daß ein fördernder oder hemmender Effekt vom Zustand der Zelloberfläche vor dem Hinzufügen des Gerinnungsenzyms bestimmt wird. Durch Hirudinzusatz ging der Einfluß des Thrombins auf die Zellproliferation vollständig verloren; der Inhibitor allein hatte keine Wirkung auf Zellwachstum oder Zellmorphologie.

b) Die Identifizierung der Proteolyseprodukte des Prothrombins Barcelona durch Faktor Xa erfolgte mit Hilfe von Hirudin. Das Human-Prothrombin Barcelona ist eine abnorme Variante, deren Aktivierung wesentlich langsamer verläuft als die des normalen Prothrombin /201/.

c) Antithrombin III hemmt sowohl Thrombin als auch Faktor Xa. Bei Messungen der Faktor Xa-Aktivität bzw. -Inaktivierung (z.B. durch Antithrombin III) kann zur Vermeidung von Störungen durch Thrombin Hirudin zugegeben werden /191/.

d) Bei der Substitutionstherapie mit Plasmafraktionen, beispielsweise mit Faktor IX-Konzentrat bei Hämophilie B, werden die Präparate auf ihren Gehalt an aktivierten Enzymen untersucht. Zur Identifizierung bzw. Differenzierung enzymatischer Aktivitäten wurde auch Hirudin verwendet, um eine unerwünschte Thrombogenität der Präparate vor der therapeutischen Anwendung zu erkennen bzw. auszuschließen /91,231/.

2.1.5 Anwendung des Hirudins zur Thromboseprophylaxe und -therapie

2.1.5.1 Protektiver Effekt des Hirudins bei experimentell induzierter Gerinnungsneigung

a) Die antithrombotische Wirkung des Hirudins

Der Thrombus, gleich welcher Genese, ist ein Produkt der Aktivierung der Gerinnungskaskade, deren zentrales Enzym Thrombin darstellt. In Kapitel 2.1.4.3 wurde die gerinnungsphysiologische Bedeutung des Thrombins ausführlich besprochen. Hirudin ist aufgrund seiner hohen und spezifischen Affinität zu diesem Enzym ein wichtiges und das bisher einzig bekannte Antikoagulans, das durch isolierte Ausschaltung des Thrombins den Gerinnungsvorgang blockiert. Seine Anwendung in vivo ist aus diesem Grunde von besonderem Interesse /158/.

Sahli (1894) /211/, Riman und Wolf (1909) /207/ bestätigten mit ihren in vivo-Experimenten die Angaben Haycrafts über die Verhinderung der Thrombenbildung bzw. von Fibrinablagerungen an in die Venen eingeführten Fremdkörpern durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit i.v. injiziertem Blutegelextrakt.

Markwardt et al. /151,153/ demonstrierten die antithrombotische Wirkung des Inhibitors im zirkulierenden Blut. Sie lösten im Tierexperiment eine intravasale Gerinnung durch Thrombininjektionen oder Gefäßwandläsionen aus, d.h. durch Bedingungen, wie sie in ähnlicher Form bei pathophysiologischen Prozessen vorliegen. Ausreichende Mengen von i.v. appliziertem Thrombin führten zum sofortigen Tod der Versuchstiere durch intravasale Thrombosierung. Bei vorheriger Hirudinisierung wurde der letale Ausgang verhindert. Bei genügend hohem Hirudinblutspiegel tolerierten die Tiere ein

Mehrfaches der letalen Thrombindosis. Nachwirkungen waren in den folgenden 3 Monaten nicht zu beobachten /150,146, 155/.

Durch sklerosierende Mittel gesetzte Gefäßwandläsionen führten zu einer gesteigerten Haft- und Agglutinationsneigung der Thrombozyten und lösten ebenfalls Thrombosierungsvorgänge aus. Binnen 30-60 min bildete sich ein gemischter Thrombus, der schließlich das Gefäßlumen völlig ausfüllte. Die Hirudinisierung mit 5 000 AT-E/kg Körpergewicht (KG) unmittelbar vor der Intimaschädigung bot einen 8-stündigen Schutz gegen die Gerinnselbildung, es konnten weder makro- noch mikroskopisch Thromben, trotz histologisch gesicherter Gefäßverletzung, nachgewiesen werden. Die Schutzwirkung des Hirudins verringerte sich entsprechend der Zunahme des Zeitintervalls zwischen Inhibitorgabe und Gefäßläsion /151,153/.

Die antikoagulatorische Aktivität des Inhibitors wurde durch folgende Parameter belegt: die Verlängerung der Thrombinzeit (PT) und der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) /145/, ein Absinken der Thromboplastinzeit nach Quick (PTZ) /113/ und in einer Zunahme der Koagulationszeit im Thrombelastogramm (TEG) /155,113/. Die Reaktions- und Koagulationszeiten im TEG zeigten, daß die Antithrombinwirkung des Hirudins dosisabhängig ist. Nach i.v. Injektion setzte die Gerinnungsverzögerung sofort ein, nach 40 min war diese bereits deutlich geringer und nach 70 min weitgehend aufgehoben /113/.

Durch Bestimmung des Hirudin-Plasmaspiegels bei Ratten nach i.v. Gabe von 2 000 und 10 000 AT-E/kg KG stellten Markwardt et al. in neueren Untersuchungen fest, daß zur Thromboseprophylaxe ca. 10 AT-E Hirudin/ml erforderlich sind. Bei dieser Konzentration betrug die partielle Thromboplastinzeit (PTT) ca. 150 % und die Thrombinzeit (TT) mehr als 5 min /159/.

Zur Verhinderung einer durch Injektion eines gerinnungsaktiven Serums oder durch Stase provozierten Thrombosierung war

die Applikation von 0,2 mg Hirudin/kg KG notwendig. Die gleiche antithrombotische Wirkung wurde auch mit einer Heparindosis von 0,2 mg/kg KG erreicht. Zur Prophylaxe von experimentellen Shunt-Thrombosen erwies sich dieselbe Heparindosis einer Dosierung von 2,0 mg Hirudin/kg KG wirkungsgleich. Geringere Hirudinmengen verhinderten hier die Bildung des Thrombus nicht. Es ist denkbar, daß zur Hemmung der Thrombin-Blutplättchen-Interaktionen höhere Hirudinkonzentrationen erforderlich sind als zur Blockierung der Thrombin-Fibrinogen-Reaktion /159/.

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß in den skizzierten Experimenten eine im Verhältnis zur potentiellen Prothrombinumwandlung (bezogen auf die insgesamt freisetzbare bzw. gebildete Menge an aktivem Thrombin) als sehr gering einzustufende Hirudinkonzentration eine Thrombosierung verhindern konnte. Hieraus wurde geschlossen, daß der Inhibitor gleich zu Beginn der Koagulation entstehende kleinste Thrombinmengen blockiert und somit primär die Auslösung der autokatalytischen Kettenreaktion hemmt /151/.

b) Einfluß des Hirudins auf die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC)

Zum Pathomechanismus der DIC

Eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) wird bei diversen Erkrankungen beobachtet. Endothelschäden an den Gefäßen, Strömungsverlangsamung, Endotoxinämie, intravasale Anhäufung proteolytischer Enzyme und durch Traumen freigesetzte prokoagulatorische Aktivitäten können zur übermäßigen Aktivierung des Gerinnungssystems und infolge Akkumulation thromboplastischen Materials zur Hyperkoagulabilität führen. Durch Ablagerung von Fibrin in den Gefäßen, bevorzugt in Niere, Lunge, Nebenniere, Milz, Leber oder Hypophyse, bilden sich Mikrothromben, die eine Minderperfusion der Kapillargebiete bedingen und somit Organschäden bzw. Nekrosen hervor-

rufen können. Ausgeprägte Formen der DIC enden in einer Hypokoagulabilität mit allgemeiner Blutungsneigung infolge eines massiven Verbrauchs bestimmter Gerinnungsfaktoren und der Thrombozyten. Häufig wird diese Verbrauchskoagulopathie durch eine reaktive Hyperfibrinolyse kompliziert bzw. verstärkt /212,183,89,180,197,84/.

Eine DIC kann z.B. initiiert werden durch:

- Aktivierung des extrinsic Systems infolge Gewebszerstörung mit Freisetzung und Einschwemmung von Gewebsthromboplastin in das Gefäßsystem;
- Aktivierung des intrinsic Systems infolge Endothelzellschädigung, Exposition aktivierender Oberflächen und verschlechterte Hämodynamik (Aktivierung von Thrombozyten);
- direkte Aktivierung des Prothrombins oder von Faktor X infolge freiwerdender proteoloytischer Enzyme aus divesen Zellen, insbesondere den Leukozyten.

Krankheitsbilder, die zu einer Verbrauchskoagulopathie prädisponieren sind u.a. die Abruptio placentae, Fruchtwasserembolien, nekrotisierende Tumoren, akute Leukämien, Hämolysen sowie alle Schock- und Sepsisformen /180,89,189,90,181, 28/.

In der Labordiagnostik fällt bei der DIC infolge des gesteigerten Verbrauchs an Fibrinogen, Prothrombin, Faktor V, Faktor VIII etc. und von Thrombozyten insbesondere ein Abfall der Konzentrationen des Fibrinogens, Antithrombin III, der Thrombozyten sowie ein Anstieg hochmolekularer löslicher Fibrinmonomerkomplexe (SFMC) auf /89,212,180,97/. Letztere sowie lösliche vernetzte Fibrinoligomere entstehen durch die gesteigerte Aktivität des Thrombins (und somit auch von Faktor XIII) und Plasmins gegenüber Fibrin oder Fibrinogen /97,134,77,47/.

Aus pathogenetischer Sicht sind die Vorgänge, die in einer disseminierten intravasalen Gerinnung münden, im wesentli-

chen als Ergebnis einer gesteigerten Thrombinaktivität zu werten. Aus diesem Grunde lag die Erprobung eines spezifischen Thrombininhibitors als Prophylaktikum und Therapeutikum der DIC nahe /165/.

Experimentelle Modelle und klinische Äquivalente

Im Tierexperiment kann eine DIC durch Bakterientoxine provoziert werden. Zwei im Abstand von 24 h gegebene Endotoxininjektionen führen zur Sanarelli-Shwartzman-Reaktion (SSR). Charakteristisch für die lokalisierte SSR ist eine hämorrhagische Nekrose in Cutis und Subcutis. So zeigte sich beispielsweise an Kaninchen nach Injektion von 0,1 mg Endotoxin i.c. in die Rückenhaut, gefolgt von 0,2 mg Endotoxin i.v. 24 h danach, um die Injektionsstelle ein ödematöser, blaurot verfärbter Reaktionsherd /84/.

Bei der generalisierten Sanarelli-Reaktion (GSR) nehmen einige Stunden nach der ersten Endotoxinininjektion die Fibrinogenkonzentration sowie die löslichen Fibrinmonomerkomplexe (SFMC) zu, und signalisieren so die Aktivierung des Gerinnungssystems. Nach der zweiten Endotoxininjektion fällt die Fibrinogenkonzentration bei anhaltender Zunahme der SFMC-Konzentration ab. Die zirkulierende Fibrinogenmenge reicht dann nicht mehr aus, um durch Komplexierung die Polymerisation der Fibrinmonomere zu unterdrücken, es entsteht Fibrin, das sich in den peripheren Gefäßen ablagert /77,134, 180,181/. Die Endotoxine bewirken auch einen deutlichen Anstieg der Serumlipide, die für die Entstehung der SSR mitverantwortlich sind, da durch Anhäufung von Endotoxinen, Serumlipiden und Gerinnungs(zwischen)produkten die Phagozytosekapazität bzw. Clearancefunktion des Retikulo-Endothelialen-Systems (RES) zunehmend blockiert wird /183,89,182/.

Als klinische Äquivalente von SSR und GSR gelten u.a. septische Zustände bei Infektionskrankheiten, septische Aborte, Coliseptikämie bei Schwangerschaften, Waterhouse-Friderich-

sen-Syndrom bei Meningokokkensepsis und Sepsis durch hämolytische Streptokokken /183,89/.

Protektiver Effekt des Hirudins

Der protektive Effekt des Hirudins gegen die Mikrothrombenbildung manifestierte sich in allen Organen. Entsprechende Untersuchungen zeigten, daß die Anwendung des Hirudins gegenüber Heparin von Vorteil ist, da die Heparinaktivität an Antithrombin III, das bei der DIC verbraucht wird, gekoppelt ist, und außerdem der aus Blutplättchen freiwerdende Thrombozytenfaktor 4 eine Anti-Heparinwirkung besitzt, somit also Heparin verbraucht und somit selbst funktionell neutralisiert wird /165,134,47/.

Haustein et al. (1965) /83/, Nowak und Markwardt (1977) /190,165/ und Ishikawa et al. (1979) /96,97/ verifizierten eindeutig die Schutzwirkung des Inhibitors Hirudin gegen DIC unabhängig von der auslösenden Primärerkrankung und eruierten die Möglichkeiten des therapeutischen Einsatzes.

Haustein und Markwardt beobachteten an Kaninchen, daß nach Hirudininjektionen (1,6 mg i.v./kg KG mit Beginn der zweiten Endotoxingabe und anschließend im stündlichen Rhythmus, insgesamt 5 mal) die lokalisierte SSR nicht zur Ausbildung kam. Bei Reduzierung der Einzeldosis oder einmaliger Hirudingabe zu Versuchsbeginn wurde die SSR nicht verhindert, da der Inhibitor relativ schnell aus dem Blut eliminiert wird, und die für das Entstehen der SSR entscheidende Thrombinmenge erst in der 2. und 3. h nach Endotoxingabe gebildet wird /84/.

In analoger Weise ging die beim Meerschweinchen durch Endotoxininfusionen hervorgerufene Endotoxinämie mit entsprechenden hämatologischen Veränderungen, Mikrothrombosierungen und Druckzunahme im rechten Ventrikel einher, d.h. mit Störungen im Sinne einer DIC und Verbrauchskoagulopathie. Die

Fibrinablagerungen in den Organen wurden in einer Studie durch Verwendung von radioaktiv markierten Fibrinogen lokalisiert; durch Messung der Radioaktivität in den Geweben wurde das Ausmaß der Mikrothrombosierung bestimmt. In Lungen, Leber, Nieren und Milz zeigte sich eine Radioaktivitätszunahme um das 3 bis 4fache. Die genannten pathologischen Vorgänge wurden durch simultane Hirudininfusionen unterdrückt /190,165,47/.

Untersuchungen von Ishikawa et al. /96,97/ bestätigten die oben beschriebenen Resultate. Eine unmittelbar nach der zweiten Endotoxininjektion angelegte Hirudininfusion von 1 000 AT-E/kg KG/h für die Dauer von 6 h verhinderte den Verbrauch an Gerinnungsfaktoren, die Mikrothrombenbildung in den Glomerula und das akute Nierenversagen bei Kaninchen. Mikrothrombosierungen in den Glomerula reduzierten deutlich die renale Ausscheidung, während die hirudinisierten Tiere eine bessere Diurese aufwiesen. Hieraus folgerten die Autoren, daß das akute Nierenversagen nicht primär auf das Endotoxin, sondern auf die Mikrothrombosierung zurückzuführen ist /97/. Die Antithrombinwirkung des Hirudins zeigte sich auch in der verlängerten Thrombinzeit und an einem erhöhten Fibrinogenspiegel bei erniedrigtem SFMC-Gehalt des Plasmas.

Die Zahl der Leukozyten wurde durch Hirudin nicht beeinflußt. Diese Zellen sind gegenüber Endotoxin sehr empfindlich: Toxine induzieren die Freigabe von Gewebsthromboplastin-ähnlichem Material und von lysosomalen neutralen Proteasen; somit könnten die Leukozyten an der Bildung der löslichen Fibrinmonomer-Komplexe bzw. der Fibrinogen-Abbauprodukte beteiligt sein. Die Thrombozytenaggregation wird sowohl durch die Wirkung des Endotoxins als auch durch die Aktivierung des Gerinnungssystems (Thrombin) stimuliert. Hirudin kann dabei nur den Anteil pathologischer Reaktionen verhindern, der auf die Wirkung des Thrombins zurückzuführen ist /97/.

2.1.5.2 Erfahrungen über die aktive und passive Hirudinisierung beim Menschen

Therapie mit Blutegeln

Wie eingangs beschrieben, fand der medizinische Blutegel seit vielen Jahrhunderten eine breite therapeutische Anwendung.

Vor Haycraft's Erkenntnis der blutgerinnungshemmenden Wirkung der Blutegelextrakte (1884 /85/) war das Hauptaugenmerk bei der aktiven Behandlung mit Blutegeln auf die Blutentziehung gerichtet, die zu Heilzwecken bei den mannigfältigsten Krankheitsbildern durchgeführt wurde /19/.

So schrieb Johannes Bohn 1732 in der Chirurgia rationalis:
"Weil wir bißhero von unterschiedenen Arten/ das Blut aus dem menschlichen Cörper abzuzapffen/ geredet haben/ so scheint es nicht uneben zu seyn/ auch etwas von Applicirung der Blutegeln zu gedencken/ als welche man gar offte/ sowohl anstatt des Schröpffens/ als des Aderlassens in Gebrauch ziehet: Denn diese Würmerchen saugen das Blut nicht nur aus den naheliegenden und kleinen Aedergen/ sondern auch aus den großen und entlegensten Theilen/ dahero kommt es/ daß ob man sie gleich wegnimmt/ dennoch das Blut noch sehr lange tröpffelt/ so gar/ daß man es offte mit blutstillenden Medicamenten zustopffen/ gezwungen wird." /19/

Im 19. Jahrhundert war die Anwendung des Blutegels in der Medizin außerordentlich stark verbreitet. So wurden beispielsweise in Frankreich 1850 ca. 100 Millionen und in Deutschland gegen Ende des 19 Jh. noch 25 Millionen Blutegel zu Behandlungszwecken verbraucht. Mit Beginn der naturwissenschaftlichen Ära haben sich die Ansichten über diese Behandlungsmethode durch Einführung der Asepsis sowie die zunehmenden Kenntnisse über hämatologische Mechanismen und die

Infektionserreger erheblich gewandelt. Bereits um die Jahrhundertwende war die Blutegelanwendung stark dezimiert /86,19/.

Bottenberg (1935) /19/ schrieb hierzu:
"Auf so wilde Übertreibungen mußte notwendigerweise ein Rückschlag erfolgen. Wir erleben nunmehr - nicht zum ersten Male in der Geschichte der Medizin! - eine völlige Wandlung ins Gegenteil: Die exaktnaturwissenschaftliche Richtung beginnt ihre Tätigkeit damit, den größten Teil des empirischen Heilschatzes der Humoralpathologie über Bord zu werfen, weil naturwissenschaftlich nicht oder ungenügend begründet. Gewiß, es verschwand damit mancher altehrwürdige Aberglaube, manche therapeutische Übertreibung. Zugleich aber auch ein ganz großer Teil der heilerischen Erfahrungen der Jahrtausende zuvor. Ein großer Teil wertvollsten Heilgutes aus der offiziellen Medizin verschwindet und wandert in die Praxis der Bader, Kräuterweiber, Kurpfuscher, Naturärzte et hoc genus omne ab. Dort fristet er jahrzehntelang ein nicht wirkungsloses Dasein."

Zur Gänze wurde die Therapie mit Blutegeln jedoch nicht aufgegeben und vielerorts weiterhin mit Erfolg praktiziert.

Termier /253,252/ propagierte immer wieder die Behandlung postoperativer Thrombosen mit Blutegeln. Henschen (1928) /87/ empfahl zur Thromboseprophylaxe die aktive Hirudinisierung unmittelbar vor der Operation, die nach seinen Erfahrungen eine deutliche Senkung der postoperativen tödlichen Embolien bewirkte.

Sulger und Bozsin (1929) /244/, Straaten (1933) /243/, Hauptstein (1934) /82/, Egelhorn (1932) /41/, Butzengeiger (1931) /21/, Moebius (1934) /176/, Oden (1933) /192/ u.a. wiesen auf die therapeutische Wirksamkeit einer Blutegelanwendung bei bereits bestehender Thrombose bzw. Thrombophlebitis hin. Sie registrierten ein schnelleres Abklingen der Entzündungszeichen wie Schmerz, Spannung und ödematöse

Schwellung. Sulger und Bozsin schrieben dieser Behandlungsform vornehmlich eine rein lokale Wirkung zu, sie glaubten im Gegensatz zu Henschen, nicht an eine Allgemeinwirkung und lehnten somit das Ansetzen der Egel zur präoperativen Thromboseprophylaxe ab.

Walsmann (1981) /268/ schreibt den therapeutischen Effekt der Blutegelanwendung einer lokalen Reizwirkung und dem Aderlaß zu, da das beim Blutsaugen sezernierte Hirudin nur in geringen Mengen in die Wunde und nicht in den Blutkreislauf gelangen dürfte.

Therapie mit Blutegelwirkstoffen

Nach den heute gültigen Vorstellungen hat der Inhibitor Hirudin gegenüber anderen Antikoagulantien einige wesentliche Vorteile:

- er reagiert sehr schnell und spezifisch mit dem Gerinnungsferment Thrombin;
- er beeinflußt die sonstige Beschaffenheit und Zusammensetzung des Blutes nicht;
- seine Aktivität ist nicht von anderen Gerinnungs- oder Plasmafaktoren abhängig;
- die Gefahr einer Überdosierung ist äußerst gering.

Diesen Vorteilen stehen die begrenzte Verfügbarkeit des Hirudins und seine relativ schnelle Eliminierung aus dem Organismus gegenüber. Aus diesen Gründen ist derzeit die Anwendung nicht über einen längeren Zeitraum möglich, sondern nur für solche Fälle geeignet, die eine schnelle und kurzfristige Reduzierung bzw. Blockierung überschießender Gerinnungsvorgänge erfordern /155,270/.

Hirudin wurde beispielsweise als ein besonders adäquates Antikoagulans für Notfalldialysen bezeichnet. Schramm et al. (1978) /221/ stellten fest, daß bereits geringe Hirudinkonzentrationen die Thrombinaktivität blockierten, was durch

einen abrupten Abfall der Fibrinopeptid A-Konzentration (von 120 ng/ml auf ca. 30 ng/ml bei Gabe von 0,1 AT-E Hirudin/ml) sowie durch die signifikante Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) dokumentiert werden konnte.

Die Behandlung oberflächlicher Thrombophlebitiden mit intrakutanen Hirudininjektionen brachte gute Ergebnisse und führte zu einer erheblichen Verkürzung der Krankheitsdauer. Unterschiede zur Therapie mit intrakutan verabreichtem Heparin wurden jedoch nicht beobachtet /63/.

Der Einfluß einer lokalen Hirudinapplikation auf die primäre Hämostase ist umstritten /246,268/. Andererseits zeigten Untersuchungen über die Effektivität von hirudinhaltigen Salben in einem Quaddelresorptionstest, daß sie hinsichtlich ihrer Wirksamkeit mit den Heparinoiden vergleichbar sind. Der Zeitpunkt des Wirkungseintritts und die Wirkungsintensität hingen wesentlich von der Salbengrundlage ab und nahmen linear mit der Wirkstoffkonzentration zu. In der Salbengrundlage enthaltene Polyglycole beschleunigten den Wirkungseintritt, während Nikotinsäureester keinen Einfluß hatten /259/.

Stock et al. /240/ machten mit der Anwendung hirudinhaltiger Salben nach Operationen an Großgelenken, u.a. nach Totalendoprothesen, varisierenden Hüftosteotomien und Knieendoprothesen ebenso gute Erfahrungen. Bei Salbenapplikationen am 5. bis 14. bzw. 21. postoperativen Tag fiel eine raschere Resorption der postoperativen Weichteilschwellung auf. Der dadurch bedingte Rückgang des Spannungsgefühls und Bewegungsschmerzes führte zu einem schnelleren Mobilisierungserfolg. Diese Befunde wurden durch Umfangs- und Bewegungsausmaß-Messungen objektiviert. Zusätzlich zur lokalen Hirudinbehandlung wurde eine low-dose Heparintherapie durchgeführt; Antiphlogistika wurden nicht gegeben. Lokale Nebenreaktioen wie Hautirritationen, Pruritus oder Brennen traten nicht auf; Hirudin scheint demnach keine allergischen Nebenwirkungen zu provozieren.

2.2 Pseudohirudin

Baskova et al. /12/ untersuchten die Hirudinpräparate im Hinblick auf ihre unterschiedliche spezifische Antithrombinaktivität und differierenden, in Kap. 2.1.2.3 beschriebenen N-Termini. Die Arbeitskreise um Markwardt /171/ und Jutisz /135/ determinierten in ihren Hirudinpräparaten aus Blutegelkopfextrakten die N-terminale Aminosäure Isoleucin, während die Arbeitsgruppe um Bagdy /69/ in den aus ganzen Blutegeln gewonnenen Präparaten Valin als N-Terminus identifizierte.

Petersen /198/ führte das Vorkommen dieser beiden NH_2-Endgruppen auf die Existenz zweier Hirudinformen, einer Valin- und einer Isoleucinform zurück. Cherkesova et al. /26/ sehen die Ursache in der Anwendung von verschiedenem Ausgangsmaterial für die Extraktherstellung zur Hirudingewinnung. Zur Bestätigung dieser Hypothese verglichen Baskova und Cherkesova /12,26/ einzelne Hirudinpräparate miteinander, die aus Blutegelköpfen, -körpern und ganzen Egeln nach einem identischen Reinigungsverfahren gewonnen wurden.

Für diese Untersuchungen wurden 1 000 medizinische Blutegel verwendet. Die Aufbereitung des Materials, d.h. die Extraktion sowie Fraktionierung mittels Aceton und Alkohol erfolgte nach der von Markwardt /156/ angegebenen Methode. Die Hirudinpräparate aus Egelköpfen wiesen gegenüber den Inhibitoren aus ganzen Egeln oder Egelkörpern eine deutlich höhere Antithrombinaktivität auf (siehe Tab. 10). Die sehr geringe Antithrombinaktivität des Präparates aus Egelkörpern (ca. 1% der Aktivität des Hirudins aus Egelköpfen) läßt sich entweder auf Beimengungen von Hirudin zurückführen oder als ein Charakteristikum des Egelkörpers selbst interpretieren /26,12/.

Die inaktive Komponente der Egelkörper mit ähnlichen physi-

kalisch-chemischen Eigenschaften und ähnlichem Verhalten während des Isolierungs- und Reinigungsprozesses wie Hirudin wurde "Pseudohirudin" genannt /26,12/.

2.2.1 Isolierung des Pseudohirudins

Die Isolierungsprozedur für Pseudohirudin ist in Abbildung 11 der Hirudingewinnung gegenübergestellt, da sich beide Substanzen während des Reinigungsvorganges identisch verhalten /13,26/.

Das Ergebnis des in Abbildung 11 dargestellten Reinigungsprozesses verdeutlicht (siehe auch Tab. 10), daß Hirudin nur aus den Köpfen des medizinischen Blutegels gewonnen werden sollte, da die Präparate aus ganzen Egeln beträchtliche Mengen inaktiven Materials aus den Egelkörpern mit ähnlichen Eigenschaften wie Hirudin enthalten. Das Mengenverhältnis von Hirudin zu Pseudohirudin pro Egel wird mit 1:3-4 angegeben /26/.

Aus Tabelle 10 ist ersichtlich, daß die aus ganzen Egeln isolierte Hirudinpräparation nur ca. 1/3 der Antithrombinaktivität des Hirudins aus den Blutegelköpfen besitzt. Diese niedrigere spezifische Aktivität führen die Autoren auf die Gegenwart eines inaktiven, sog. Pseudohirudins zurück /12/.

Abb. 11: Isolierung von Pseudohirudin nach Baskova et al. /12/

Blutegelkörper [AT-E/mg]	←——Ausgangsmaterial——→ ←—Spezifische Aktivität—→ nach	Blutegelköpfe [AT-E/mg]
11	Präzipitation mittels Aceton	350
20	Fraktionierung mittels Äthanol Fraktionen in 0,1 M Natriumbicarbonat / 0,5 M NaCl, pH 8,0 gelöst	1 170
	Auftrennung durch Affinitätschromatographie an Trypsin-Sepharose-Säule /140/ und Elution mit o.g.Puffer, pH 8,0; Entsalzung über Sephadex G-25; Lyo-	
21	philisation	1 150
	Bdelline * verbleiben an der Trypsin-Sepharose-Säule und können mit 0,2 M KCl, pH 2 eluiert werden	
	Reingewinnung der hirudin- und pseudohirudinhaltigen Fraktionen durch isoelektrische Fokussierung in einem Saccharose-Gradienten an einer LKB 8100-2 Säule im pH Bereich 3-5	
48	I (pH 3,8)	2 200
52	II (pH 3,9)	4 250
-	III (pH 4,0)	910
Pseudohirudin		Hirudin

Die Bestimmung der Antithrombinaktivität erfolgte mittels eines Standard-Thrombinpräparates mit einer Aktivität von 21,7 NIH-E/mg Trockengewicht /13,12/.

* Inhibitoren für Trypsin, Plasmin und Akrosin, siehe Kapitel 2.3.

Tab. 10: Spezifische Antithrombinaktivitäten der Präparate aus Blutegelköpfen, -körpern und ganzen Egeln nach den einzelnen Reinigungsschritten (nach Baskova und Cherkesova /12/).

Reinigungsschritt	Spezifische Antithrombinaktivität [AT-E/mg]		
	Hirudin		Pseudohirudin
	Egelköpfe	ganze Egel	Egelkörper
Extraktion, Präzipitation mit Aceton	350	72	10
Fraktionierung mit Äthanol	1 170	165	20
Affinitätschromatographie an Trypsin-Sepharose	1 570	200	21
Isoelektrische Fokussierung			
Fraktion:			
I (Ip 3,8)	2 200	700	48
II (Ip 3,9)	4 250	1 200	52
III (Ip 4,0)	910	-	-

2.2.2 Charakterisierung des Pseudohirudins

Pseudohirudin ist vermutlich ein Stoffwechselprodukt des Hirudins, das unter Umständen durch Abspaltung eines N-terminalen Peptidfragmentes, wahrscheinlich durch Hydrolyse der einzigen Arg-Val-Peptidbindung im Hirudinmolekül, entsteht. Das Fragment hat ein Molekulargewicht von ca. 2 000 /14/.

Das Pseudohirudinmolekül hat im Gegensatz zum Hirudinmolekül nur eine Disulfidbrücke, die offensichtlich für die Aktivität des Moleküls gegenüber Thrombin eine wichtige Rolle

spielt. Diese Aussage stützt sich auf die Tatsache, daß die Antithrombinaktivität des Hirudins, wie in Kapitel 2.1.3.1.1 besprochen, durch Konformationsänderung infolge chemischer Modifikationen der S-S-Brücken verloren geht /268,14/.

Die Molekulargewichte des Pseudohirudins und Hirudins (siehe Tabelle 11) wurden ermittelt durch:

- Elektrophorese in 10%- und 15%igem Polyacrylamid-Gel in Gegenwart von Natrium-dodecylsulfat (DS-Na) sowie Beta-Mercaptoäthanol /14/,
- Gelfiltration über Sephadex G-75, äquilibriert mit 4,4%iger Ameisensäure, pH 1,9 /3/.

Vermutlich sind die Komponenten mit hohem Molekulargewicht durch Oligomerisierung der monomolekularen Form (M_r ca.7 000 für Hirudin und ca. 5 000 für Pseudohirudin) entstanden; das Pseudohirudin-Monomer besitzt eine hohe Assoziierungstendenz /14/.

Tab. 11: Molekulargewichte der nach isoelektrischer Fokussierung erhaltenen Fraktionen des Pseudohirudins und Hirudins nach Baskova et al. /14/

Bestimmungsmethode	Pseudohirudin-Fraktionen		Hirudin-Fraktionen	
	I	II+III	I	II+III
Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (mit Natrium-dodecylsulfat)	24 500	22 000	-	22 500
	16 200	16 000	13 500	15 000
	-	-	9 300	11 350
Gelfiltration über Sephadex G-75	18 200	-	-	-
	9 120	-	7 100	-
	5 000	-	-	-

Es wird angenommen, daß Ähnlichkeiten in der Ladungsverteilung auf der Molekülоberfläche von Pseudohirudin und Hirudin für die Affinität des Pseudohirudins zum Thrombin mitverantwortlich sind.

In Hirudinpräparaten aus Blutegelköpfen, die durch Komplexierung mit Thrombin gereinigt wurden, kommen Spuren des inaktiven Pseudohirudins vor. Dies konnte durch Nachweis des N-terminalen Valins und der Val-Val-Peptidbindung belegt werden /14,12/.

2.2.2.1 N-terminale Aminosäure

Mit der Dansyl-Methode nach Gray /72/ analysierten Cherkesova et al. /26/ die N-Termini der mittels isoelektrischer Fokussierung aufgetrennten Hirudin- und Pseudohirudinfraktionen und identifizierten die Dansylderivate durch Dünnschichtchromatographie. In Übereinstimmung mit den Resultaten von Markwardt /171/ und de la Llosa /135/ wurde in den aus Blutegelköpfen isolierten Hirudinfraktionen die Aminosäure Isoleucin, im Hirudin aus ganzen Egeln sowohl Isoleucin als auch Valin, und in den Pseudohirudinpräparationen aus Blutegelkörpern das N-terminale Peptid Val-Val bestimmt /12/.

Die Identifizierung des Valins als N-Terminus in einigen Hirudinpräparationen wird von Baskova und Cherkesova auf die Beimengung von Pseudohirudin und nicht als Hinweis auf das Vorkommen einer Isoform des Hirudins gewertet /12/.

2.2.2.2 Aminosäurezusammensetzung

Die Bausteine des Pseudohirudins wurden, wiederum im Vergleich zur Aminosäurezusammensetzung des Hirudins, nach Fraktionierung mittels isoelektrischer Fokussierung und 24 h Hydrolyse in 6 N HCl bestimmt.

Wie aus Tabelle 12 ersichtlich ist, hat Hirudin im Vergleich zu Pseudohirudin einen höheren Gehalt an Asparagin- und Glutaminsäure sowie an Lysin, Isoleucin und Tyrosin. Das Pseudohirudin weist 1 Disulfidbrücke in seinem Molekül auf, während das Hirudinmolekül 3 S-S-Brücken besitzt. Die Differenz der Molekulargewichte zwischen beiden Monomeren von ca. 2 000 entspricht der um ca. 20 Bausteine höheren Aminosäurezahl im Hirudinmolekül /14/.

Tab. 12: Aminosäurezusammensetzungen des Pseudohirudins und des Hirudins nach Baskova et al. /14/

Aminosäuren	Pseudohirudinfraktionen		Hirudinfraktionen	
	I	II + III	I	II + III
Asp	7,54	11,68	13,5	18,01
Thr	6,55	7,28	6,99	7,74
Ser	8,62	7,09	6,47	7,83
Glu	10,83	13,99	16,0	18,36
Pro	7,13	7,33	5,0	8,34
Gly	9,0	9,0	9,0	9,0
Ala	4,34	5,28	4,0	5,02
Cysl/2 *	2,03	2,7	8,0	12,5
Val	4,54	5,36	3,54	4,51
Ile	1,06	1,48	2,73	3,39
Leu	2,56	3,73	3,94	4,93
Tyr	1,52	2,81	3,63	4,79
Phe	1,40	2,19	1,54	2,09
His	2,34	3,94	1,7	2,83
Lys	4,01	4,78	7,04	7,43
Arg	1,74	1,67	1,65	3,22
Met	-	-	-	-

* ohne Perameisensäure-Oxidation

2.3 B d e l l i n e

Fritz et al. stellten fest, daß mehrere Hirudin-Handelspräparate außer einer Hemmaktivität gegenüber Thrombin auch inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin, Plasmin und Akrosin aufwiesen. 1969 gelang es, die dafür verantwortlichen Protein-Proteinase-Inhibitoren zu isolieren; sie wurden nach einem Vorschlag von R. Marx "Bdelline" genannt /57/.

Untersuchungen von Marx ergaben, daß diese Hemmstoffe nicht nur in den Speicheldrüsen des Hirudo medizinalis, sondern im ganzen Egelkörper - mit einer höheren Konzentration im Bereich der äußeren Geschlechtsorgane - zu finden sind. Es wird deshalb ein Zusammenhang hinsichtlich der physiologischen Funktionen der Bdelline und der Trypsin-Plasmin-Inhibitoren in Samenblasen und Seminalplasma des Menschen und vieler Tiere vermutet /54,56/.

Die von Zwilling (1968) /281/ beobachtete Hemmung proteolytischer und esterolytischer Aktivität einiger Endopeptidasen (die spezifisch die synthetischen Substrate Benzoyl-argininäthylester und Acetyl-tyrosinäthylester hydrolysieren) durch Hirudinpräparate von Serva-Heidelberg (4 080 AT-E/mg), wurde nun auf die Bdelline und nicht auf Hirudin, wie zuerst vermutet, zurückgeführt /117/. Von Markwardt et al. gewonnenes Hirudin mit einer Antithrombinaktivität von 11 600 AT-E/mg enthielt keine Bdelline /57/.

2.3.1 Isolierung der Bdelline

Zur Gewinnung der in käuflichen Hirudinpräparaten (ca. 270 AT-E/mg) enthaltenen Bdelline wurde, wie in Abbildung 12 und Tabelle 13 schematisch dargestellt, verfahren /54,56/.

Abb. 12: Isolierung der Bdelline nach Fritz et al. /54/

Hirudin-Handelspräparat — ca. 270 AT-E/mg *
ca. 1 IU Trypsinhemmakt./mg **

Trennung der Bdelline von Hirudin an DEAE-Cellulose, (0,2 M Natriumacetat, pH 6,0). Das Präparat wurde im Elutionspuffer gelöst auf die Säule aufgetragen, 94-95% der Trypsinhemmaktivität wurden wieder eluiert.

Elution des retenierten Hirudins mittels eines linearen Gradienten aus o.g. Pufferlsg. und 0,6 M NaCl, 0,6 M Na-Acetat, pH 6,0.

Eluat enthält 75 % der Hirudinausgangsaktivität /56/

Fraktionen des Trypsin-Plasmin-Inhibitors

- vereinigt und durch Ultrafiltration /56/ oder
- im Vakuum eingeengt und mittels Dialyse /54/ oder
- an Sephadex G-25/ Bio-Gel P-2 oder
- mit Merck Gel PGM-2000 (0,1-0,01 M Essigsäure) /56/

entsalzt und lyophilisiert.

Fraktionen der Bdelline — 25 IU/ml

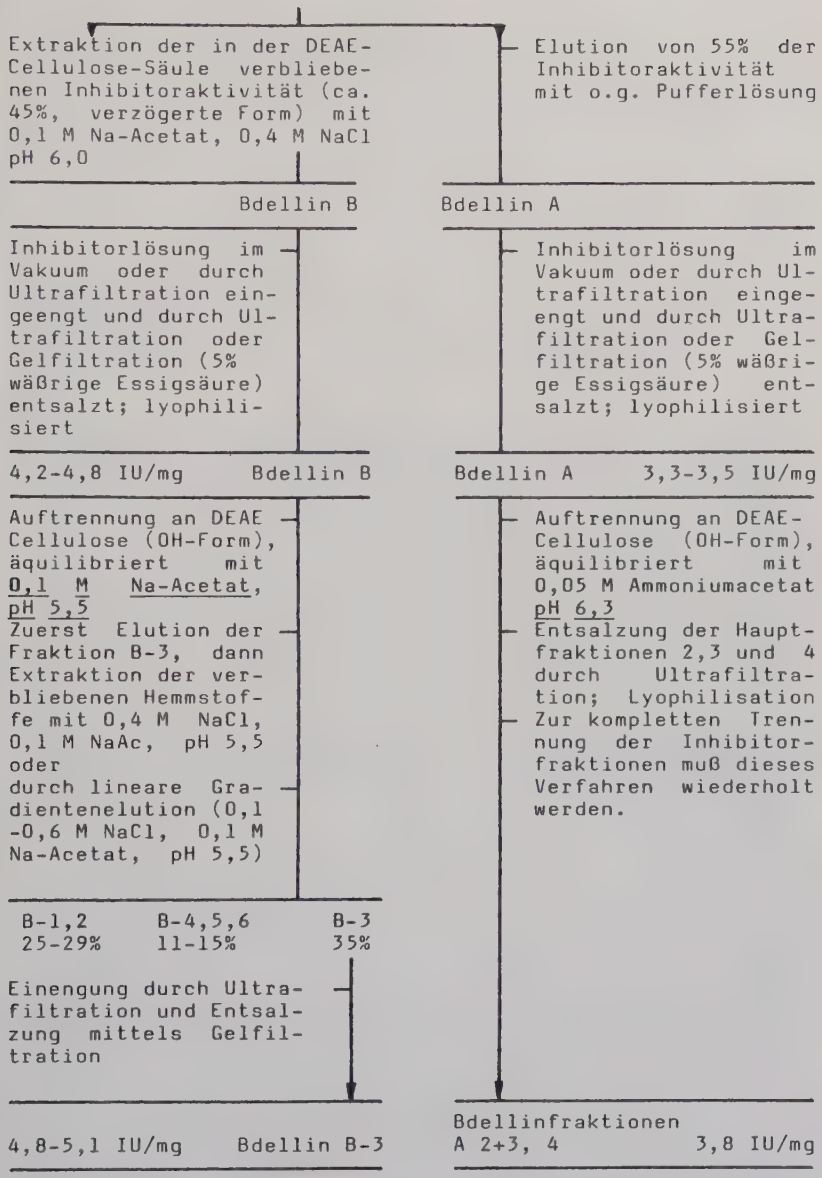
Affinitätschromatographie #

- Wiederholte Vorbehandlung des Adsorbens, ein wasserunlösliches Trypsinharz /53,48/, mit Salzlösungen (s. u.), bis sich keine Trypsinaktivität mehr ablöst
- Suspension der auf pH 7,8 äquilibrierten Trypsin-Cellulose in Bdellinlösung, pH 7,8 und ca. 0,4 M Na^{+}
- Entfernung von Beimengungen durch mehrmalige Suspension des Adsorbens in der Pufferlösung vom pH 7,8
- Dissoziation der Hemmstoffe vom Trypsin und Elution durch mehrfache Suspension in Pufferlösung (1,0 M KCl-HCl),pH 2,5. 80-95% der Bdelline sind in den sauren Extrakten enthalten /56/.
- Neutralisation der Inhibitorlösung und Entsalzung mittels Ultrafiltration oder Gelfiltration an Sephadex G-25; Lyophilisierung

Waschlösungen abzentrifugiert

Bdelline — 3,5-4,2 IU/mg

Trennung der Bdelline in die Fraktionen A und B
- Auftrennung des Bdellin A,B -Gemisches an DEAE-Cellulose (OH-Form), äquilibriert mit 0,1 M Na-Acetat, pH 6,0



* Entspricht dem Roh-Hirudin von 500 AT-E/mg nach dem Isolierungsverfahren von Markwardt (s. Kap. 2.1.1) /56/.

** IU = Inhibitor-Einheit. 1 IU entspricht der Reduktion der Enzym-katalysierten Substrathydrolyse (Benzoyl-arginin-p-nitroanilid) um 1 µmol/min /55/.

\# Wasserunlösliches Trypsinharz (Trypsin polymer gebunden an CM-Cellulose, 7-10 U/mg) bindet nur die Trypsin-Plasmin-Hemmstoffe, der Thrombininhibitor bleibt in Lösung /53/.

1 g des Hirudin-Handelspräparates (270 AT-E/mg) enthielt, nach dem Ergebnis dieses Reinigungsprozesses zu urteilen, ca. 230 mg Bdelline und nur 27 mg Hirudin /54/.

Tab. 13: Zusammenfassung der Isolierungsergebnisse für die Trypsin-Plasmin-Inhibitoren "Bdelline" aus Hirudin-Handelspräparaten nach Fritz et al. /57,54,56/.

Reinigungsschritt	Spezif. Aktivität [IU/mg]	Ausbeute [%]
Hirudinpräparat	0,9 - 1,0	
Trennung der Bdelline vom Hirudin an DEAE-Cellulose (Acetatform)		95
Trennung von Beimengungen mittels Affinitätschromatographie	3,5 - 4,2	75
Auftrennung des Bdellingemisches in die Fraktionen A und B an DEAE-Cellulose (OH-Form)	3,3 - 3,5 (A) 4,2 - 4,8 (B)	55 45
Bdellin A	3,8	80
Fraktionen		1 2,3 4 5
Verteilung der Hemmaktivität in [%]		14 37 11 14
Bdellin B	4,8 - 5,1	83
Fraktionen		1 2 3 4,5,6
Verteilung der Hemmaktivität in [%]		7 18 34 12

2.3.2 Charakterisierung der Bdelline A und B

Aus den Extrakten des medizinischen Blutegels wurden zwei mit A und B benannte Typen des Protein-Proteinase-Inhibitors Bdellin isoliert. Jede der beiden Gruppen läßt sich chromatographisch in multiple Formen auftrennen. Die prozentuale Verteilung der Inhibitoraktivität auf die einzelnen Fraktionen innerhalb der Bdelline A- bzw. B-Typen ist in Tabelle 13 wiedergegeben /54,56/.

Die aus den Aminosäurezusammmensetzungen oder mittels Gelfiltration über Sephadex G-75 berechneten Molekulargewichte liegen für die Bdelline A bei 7 000 und für die Bdelline B bei 5 600 /54/. Ihr isoelektrischer Punkt liegt zwischen pH 4 und 6 /48/. Kohlenhydrate und freie Sulfhydrylgruppen wurden in den Hemmstoffmolekülen nicht gefunden; wie die meisten Proteinaseinhibitoren enthalten sie eine relativ hohe Anzahl an Disulfidbrücken /54/.

Bdellin B-3 weist von den isolierten Bdellinkomponenten die höchste spezifische Hemmaktivität auf und gehört mit seinem Molekulargewicht von 4 968 zu den kleinsten Protein-Endoproteinaseinhibitoren. Es wird angenommen, daß seine Polypeptidkette über 3 Disulfidbrücken vernetzt ist /117/.

Die Bdelline A und B gehören zu den sog. Lysin-Inhibitoren, d.h. ihr reaktives Zentrum wird von einem Lysinrest gebildet (dieser Rest taucht in die Spezifitätstasche des Trypsins bzw. Plasmins bei der Komplexbildung). Das Hemmzentrum wurde aufgrund des Einflusses von Maleinsäureanhydrid und Butandion-(2,3) auf das Hemmverhalten der Inhibitoren gegenüber den spezifischen Enzymen identifiziert. Die Acylierung der Aminogruppen von Lysylresten mit Hilfe von Maleinsäureanhydrid bewirkt die Inaktivierung der Lysin-Hemmstoffe, während die spezifische Modifikation der Guanidinogruppen der Arginylreste mit Butandion-(2,3)-Reagens die Inaktivierung der sog. Arginin-Inhibitoren verursacht /49,129/.

Durch die Behandlung mit Maleinsäureanhydrid büßten die nativen Formen der Bdelline ca. 96% ihrer Hemmaktivität gegenüber Trypsin und Plasmin ein. Dieser Aktivitätsverlust durch Acylierung ist reversibel. Bei der Deacylierung in saurer Lösung gewannen die Bdelline ihre inhibitorische Wirkung zurück /49/.

Durch Inkubation mit Trypsin in schwach saurem Milieu wird die Peptidbindung im reaktiven Zentrum gespalten, es entstehen sog. modifizierte Inhibitoren. Werden die modifizierten Inhibitoren mit Carboxypeptidase B inkubiert, so verlieren sie durch Abspaltung des basischen Lysin- oder Argininrestes im reaktiven Zentrum ihre Hemmaktivität. Da die isolierten Präparationen von Bdellin A, A-4, B und B-3 15-20% ihrer Hemmaktivität bei der Inkubation mit Carboxypeptidase B verloren, ist davon auszugehen, daß sie teilweise in modifizierter Form vorlagen. Die Modifizierung der Hemmstoffe erfolgte vermutlich während des Kontaktes mit dem Trypsinharz, insbesondere während der Ablösungsphase /54,48,44/.

Untersuchungen über die Verteilung und Ausscheidung der Bdelline nach intravenöser Injektion an Ratten zeigten eine geringfügige kurzfristige Anhäufung der Hemmstoffe in der Leber und eine Eliminierung von 46-93% der verabreichten Aktivität im 24-Std.-Harn der Ratten /58/.

2.3.2.1 Aminosäurezusammensetzung der Bdelline A und B

Fritz et al. (1971) /54/ ermittelten die Bausteine (siehe Tabelle 14-1 und 14-2) der nach dem in Abbildung 12 beschriebenen Trennverfahren isolierten Bdelline; sie führten die quantitative Bestimmung im Nanomolbereich mit der von Krejci und Machleidt /118/ entwickelten Methode im automatisierten Aminosäureanalysator durch.

Tab. 14-1: Aminosäurezusammensetzungen der Bdellin A-Fraktionen /56/

Bdellinfraktion	A	A-1	A-1a	A-2,3	A-4
Hydrolysezeit [h]	20	20,70	20,70	20,70*	20,70*
Asparaginsäure	7,19	6	6	8	7
Threonin	3,01	2,6		3	3
Serin	2,97			3	3
Glutaminsäure	6,45	6	6	5	5
Prolin	2,80	2,3	2	3	3
Glycin	4,73	5	5	4	4
Alanin	3,96	3		4	4
Cystin/2	9,41			10	10
Valin	4,19[b]	3,4	4	5	5
Methionin	0,42			1	1
Isoleucin	1,01[b]			1	1
Leucin	1,58	2	2	1	1
Tyrosin	1,21			1	1
Phenylalanin	1,95		1	2	2
Lysin	4,82[b]	3	3	5	5
Histidin	2,80	2		3	3
Arginin	1,05	1,6	1	0	0
Tryptophan	0,12[c]			0	0
Cysteinsäure				9,10[a]	9,16[a]
Met-Sulfoxid				0,81[a]	0,95[a]
Summe				59	58
Molekulargewicht			5 965	6 339	6 224

* nächste gradzahlige Werte
a nach Oxidation mit Perameisensäure
b 70 h Hydrolysenwert
c spektralphotometrische Bestimmung

Tab. 14-2: Aminosäurezusammensetzungen der Bdellin B-Fraktionen /56/

Bdellinfraktion	B	B-1	B-2	B-3	B-4,5,6
Hydrolysezeit [h]	20	20	20	20,70 *	20 *
Asparaginsäure	5,21			5	7
Threonin	3,39	3	3,7	4	
Serin	1,93		2,7	2	4
Glutaminsäure	5,81	5		6	8
Prolin	0,60	1,4	1	0	1
Glycin	3,71			4	
Alanin	3,42	3,5		4	
Cystin/2	4,32			6	
Valin	4,08			4	
Methionin	0,19			0	
Isoleucin	0,19		0,3	0	0,3
Leucin	1,69	1,6		2	
Tyrosin	0,95			1	
Phenylalanin	0,35	0,4		0	0,5
Lysin	1,75	2	1,5	1	2
Histidin	6,15			6	
Arginin	1,01	0,6		1	
Tryptophan	0,12 [b]			0	
Cysteinsäure				5,60 [a]	
Met-Sulfoxid				0,05 [a]	
Summe				46	
Molekulargewicht				4 830	

* nächste gradzahlige Werte
a nach Oxidation mit Perameisensäure
b spektralphotometrische Bestimmung

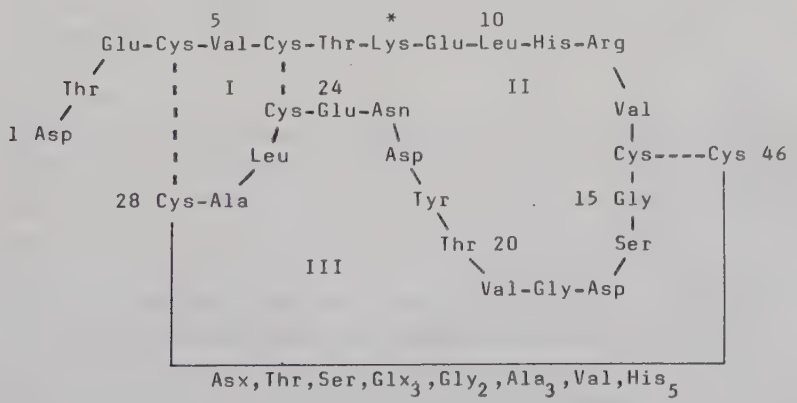
Die beiden Bdellingruppen A und B zeigen beachtliche Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung, besonders in der Anzahl der Disulfidbrücken. Durch Rechromatographie gewonnene Präparationen wurden für die Analyse der Inhibitoren A-2,3, A-4 und B-3 verwendet. Chromatographisch ließ sich die Inhibitorform A-2,3 in zwei Fraktionen A-2 und A-3 auftrennen, die jedoch sowohl in ihrem chromatographischen Verhalten als auch in ihrer Aminosäurezusammensetzung identisch waren /54/.

Bemerkenswert ist, daß Bdellin B-3 die folgenden Aminosäuren nicht enthält: Prolin, Methionin, Isoleucin, Phenylalanin und Tryptophan /54/.

2.3.2.2 Aminosäuresequenz von Bdellin B-3 und strukturelle Homologien

Krejci und Fritz (1975) /117/ untersuchten die Primärstruktur von Bdellin B-3. Durch enzymatische Spaltung mittels Trypsin und/oder Chymotrypsin nach Oxidation mit Perameisensäure wurden charakteristische Peptide erhalten, die zur weiteren Sequenzermittlung entsprechenden Abbauprozeduren (nach Edman) unterworfen wurden. Die bis zu Position 28 des Bdellinmoleküls ermittelte Reihenfolge der Aminosäurebausteine ließ eine eindeutige strukturelle Homologie zu den sekretorischen Trypsininhibitoren vom Kazal-Typ erkennen. Allerdings zeigt das Bdellinmolekül insofern eine Besonderheit, als der erste Disulfidloop (I) bedeutend kleiner ist als bei allen anderen bislang bekannten Kazaltyp-Inhibitoren (siehe Abbildung 13).

Abb. 13: Schematische Darstellung der für Bdellin B-3 ermittelten partiellen Aminosäuresequenz /117/



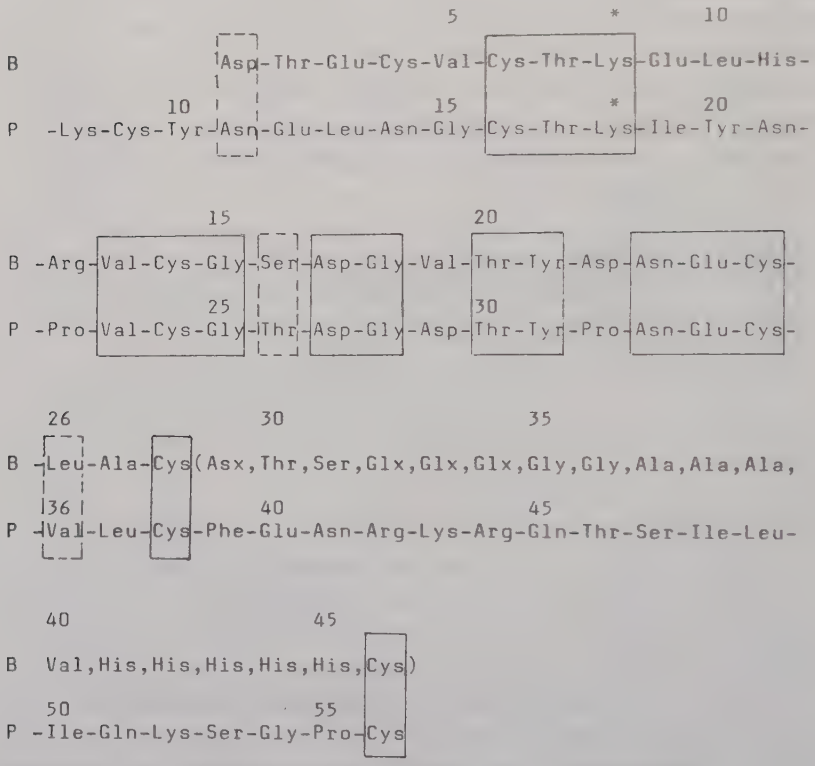
---- Vermutete Lokalisation der S-S-Brücken in Analogie zu den strukturhomologen pankreatischen sekretorischen Trypsininhibitoren (PSTI): Cys 4 und Cys 28, Cys 6 und Cys 25, Cys 14 und Cys 46 /117/

* reaktives Zentrum

I,II.III Disulfidloops

Strukturvergleiche (siehe Abbildung 14) zeigten die homologen Bereiche der Sequenzen von Bdellin B-3 und den sekretorischen Trypsininhibitoren (Kazal-Typ) aus Human- /56/, Rinder- /74,206/ und Schweinepankreas /73,261/; zu diesen Inhibitoren dürfte auch der Akrosininhibitor HUSI II aus menschlichem Seminalplasma strukturhomolog sein /214/.

Abb. 14: Strukturvergleich zwischen Bdellin B-3 (B) und dem Trypsininhibitor aus menschlichem Pankreas (P) /56/



vollständige Homologie

eingeschränkte Homologie

Sequenzen des Bereiches der reaktiven Peptidbindung (unterstrichen) bzw. des reaktiven Zentrums (*) von Bdellin B-3, dem sekretorischen Trypsininhibitor aus menschlichem Pankreas (PSTI) und dem Akrosininhibitor aus Seminalplasma des Ebers /117,214/:

	6	*	10
Bdellin B-3	-Cys-Thr-	Lys-	Glu-Leu-
	16	*	20
Humaner PSTI	-Cys-Thr-	Lys-	Ile-Tyr-
	17	*	21
Akrosininhibitor	-Cys-Thr-	Arg-	Gln-Met-

Die Ähnlichkeit der Sequenzen dieser Inhibitoren im Bereich der Kontaktstellen mit ihren Zielenzymen trypsinähnlicher Spezifität (neben Trypsin gegebenenfalls Plasmin und Akrosin) ist besonders augenfällig. Der basische Lysin- bzw. Argininrest ist dabei für eine "nahtlose" Interaktion mit der Spezifitätstasche des Enzyms prädestiniert; die Affinität zwischen Inhibitor und Enzym wird jedoch auch durch die Art der das reaktive Inhibitorzentrum umgebenden Aminosäurereste beeinflußt, da die Gesamtkonfiguration des Kontaktbereiches zwischen Inhibitor und Enzym für die Assoziationstendenz mitbestimmend ist.

2.3.3 Hemmspektrum der Bdelline - Inhibitoraktivität gegenüber Trypsin, Plasmin und Akrosin

Die Bdelline hemmen Trypsin, Plasmin und Akrosin unter Bildung äquimolarer Enzym-Inhibitor-Komplexe /56,52/.

Die Serinprotease Trypsin wird im Dünndarm durch Aktivierung ihres aus dem Pankreas sezernierten Zymogens, dem Trypsino-

gen, gebildet. Das Enzym besteht aus einer Polypeptidkette, deren räumliche Konfiguration durch 6 Disulfidbrücken stabilisiert wird. Sein Molekulargewicht beträgt ca. 23 000 und sein pH-Optimum liegt bei 8,0 /278/. Unter den Verdauungs-Endopeptidasen hat das Trypsin die ausgeprägteste Substratspezifität: es spaltet selektiv Lysyl- oder Arginylbindungen. Die hohe Affinität des Trypsins zu diesen Aminosäureresten im reaktiven Zentrum des Inhibitors, sowie zusätzliche Bindungskräfte zu anderen, benachbarten Resten (s.o.) sind für die geringe Dissoziationsneigung des Enzym-Inhibitor-Komplexes verantwortlich /49/.

Die inaktive Vorstufe der trypsinähnlichen Serinprotease Plasmin, das Plasminogen, zirkuliert im Blut. Die katalytische Aktivität des zweikettigen Enzyms ist in der leichten (kürzeren) Kette (233 Aminosäuren) lokalisiert. Für Plasmin wurde ein Molekulargewicht von 79 400 /60/ bzw. 82 900 /278/ bestimmt, sein pH-Optimum liegt bei 8,0 /278/. Plasmin weist eine dem Trypsin analoge Spaltungspräferenz für Lysyl- und Arginylbindungen auf /49/. Es ist das zentrale Enzym der Fibrinolyse: es baut Fibringerinnsel zu löslichen Spaltprodukten ab. Einige Fibrinolyseprodukte üben eine hemmende Wirkung auf die Polymerisation von Fibrinmonomeren und damit die Fibrinbildung aus und dienen somit der Erhaltung des hämostatischen Gleichgewichtes.

Chemische Modifikationen an den Bdellinen, die mit einem Verlust der Inhibitoraktivität gegenüber Trypsin einhergehen, haben den gleichen Effekt auf die Hemmwirkung gegenüber Plasmin /129/.

Die trypsinähnliche Proteinase Akrosin ist in der sog. Akrosomenkappe, i.e. eine sackähnliche Struktur am vorderen Teil des Spermiumkopfes, lokalisiert /260/. Seine proteolytische Wirksamkeit ist wie bei den o.g. Enzymen auf Arginyl- und Lysylbindungen limitiert /49/. Das Molekulargewicht des Human-Akrosins beträgt ca. 30 000, sein pH-Optimum liegt bei 8,0 /277/; im pH-Bereich von 2-3 ist es ohne Aktivitätsver-

lust über Wochen stabil /59/. Akrosin ist ein wichtiges Enzym im Befruchtungsprozeß: es übt u.a. einen lytischen Effekt auf die Zona pellucida des Ovum aus und erleichtert dadurch das Eindringen des Spermiums in die Eizelle /278,239/. Im Ejakulat freigesetztes Akrosin wird durch rasche Komplexbildung mit einem Inhibitor des Seminalplasmas vollständig gehemmt und kann somit nicht direkt nachgewiesen werden, sondern erst nach Dissoziation des Akrosin-Inhibitor-Komplexes im sauren Milieu (pH 2,2-2,7). Der natürliche Antagonist des menschlichen Akrosins ist der säurestabile Proteaseinhibitor HUSI II (MG ca. 6 500) des menschlichen Spermaplasmas /214,278,277,213,50,76,95/.

Ferner berichteten Bang et al. /7/, daß hochgereinigtes Akrosin in einer langsamen Reaktion Fibrinogen in Fibrin und in einer schnellen Reaktion Prothrombin in Thrombin umwandelt. Es kann auch das Wachstum von Fibroblasten in Zellkultur stimulieren.

Es wird heute angenommen, daß die enzymatischen Reaktionsmechanismen von Trypsin und Akrosin sehr ähnlich sind, einschließlich des Baus ihrer Spezifitäts- bzw. Substratbindungstasche und der Art der an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste /59,215/.

Die Spaltungsspezifität gegenüber bestimmten synthetischen Substraten wird heute bevorzugt zur Aktivitätsbestimmung angewandt. Solche Substrate zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit und Selektivität aus. Zur Bestimmung der Aktivität und Hemmung von Trypsin, Plasmin (nicht Human-Plasmin /106/) und Akrosin wurde das synthetische Substrat N-Alpha-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) verwendet. Die Freisetzung des p-Nitroanilins aus BAPNA läßt sich durch die Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 405 nm direkt verfolgen. Die Verminderung der Extinktionsänderung gegenüber einem Vergleichswert ohne Inhibitorzusatz dient als Maß für den Inhibitorgehalt der Testlösung /49,60/. Mit Hilfe von N-Benzoyl-arginin-äthylester (BAEE) wurde die Aktivi-

tät von Human-Plasmin bzw. von Plasminhemmstoffen quantitativ nachgewiesen /60,117,59,106/.

Bdellin B-3 zählt zu den stärksten Inhibitoren des Human-Akrosins, während seine Affinität zu Human-Plasmin relativ gering ist. Die Bdelline A besitzen demgegenüber eine besonders starke Hemmaktivität gegenüber Human-Plasmin, siehe hierzu auch Tabelle 15. Die Dissoziationskonstante K_i des Akrosin-Bdellin B-3-Komplexes liegt unter 0,1 nmol/l /52/.

Bei der Verwendung käuflicher Hirudinpräparate in experimentellen und klinischen Studien ist zu beachten, daß durch die darin enthaltenen Wirkstoffe sowohl die Endphase der Gerinnung (Thrombin) als auch die Fibrinolyse (Plasmin) effektiv gehemmt werden. Dadurch wird die Interpretation der Resultate gegebenenfalls sehr erschwert /56/.

Tab. 15: Inhibitorische Wirksamkeit der Bdelline nach Fritz und Krejci /56/

Enzyme	Substrate	Bdellin A	Bdellin B
Trypsin, Rind	BAPA	++	++
Plasmin, Mensch	BAEE	++	+
Schwein	BAPA	++	++
Akrosin, Mensch	BAPA	+	+
Eber	BAPA	+	++

++ sehr starke Hemmung
+ mäßige bis starke Hemmung
BAPA = N-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid
BAEE = N-Benzoyl-argininäthylester

2.3.4 Potentielle Anwendungsbereiche für Bdelline

Im Hinblick auf die starke und relativ spezifische Hemmwirkung von Bdellin B-3 gegenüber Human-Akrosin wurde die Möglichkeit eines Einsatzes als Kontrazeptivum diskutiert /56,52/.

Die selektive Hemmaktivität der Bdelline A gegen Human-Plasmin wurde bei experimentellen Untersuchungen mit Human-Plasma-Kallikrein zur Ausschaltung störender Einflüsse von Human-Plasmin auf die Versuchsresultate ausgenutzt /106/. Ein therapeutischer Einsatz von Bdellin A würde es ermöglichen, die Plasminaktivität und damit die Fibrinolyse selektiv zu inhibieren.

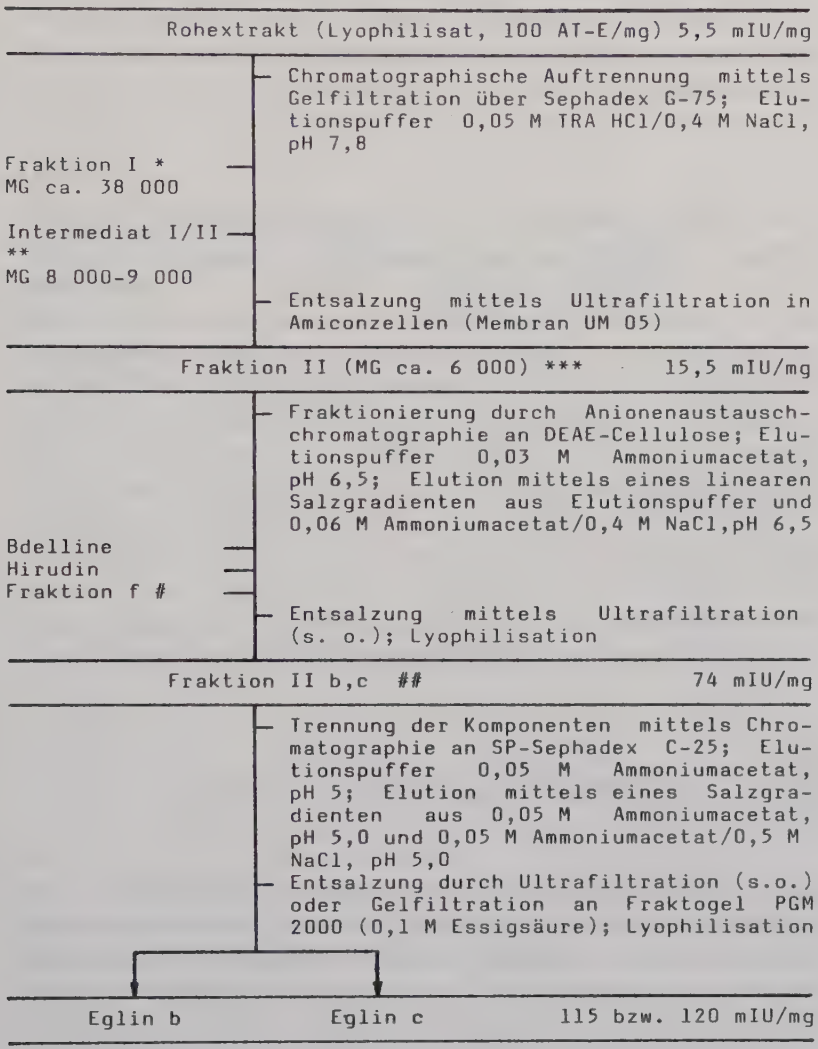
2.4 Egline

Bereits bei der Reindarstellung der Bdelline beobachteten Fritz et al., daß Hirudinpräparate auch eine gegenüber Alpha-Chymotrypsin des Rindes inhibitorisch aktive Substanz enthielten, die nicht den Trypsin-Plasmin-Hemmstoffen zuzuordnen war. 1977 isolierten Seemüller et al. /230/ aus Roh-Hirudin ein Protein mit Hemmaktivität gegenüber Chymotrypsin, Subtilisin sowie Elastase und Kathepsin G aus Humangranulozyten. Dieser Wirkstoff wurde "Eglin" genannt.

2.4.1 Isolierung der Egline

Als Ausgangsmaterial für die Reingewinnung der Egline verwendeten Seemüller et al. /230,227/ einen mittels Acetonfällung gewonnenen Blutegelextrakt mit einer Thrombinhemmaktivität von 100 AT-E/mg. Dieses Roh-Hirudin war inhibitorisch aktiv gegenüber Rinder- und Human-Thrombin, Rinder-Trypsin und -Chymotrypsin, Elastase und Kathepsin G aus neutralen polymorphkernigen Granulozyten vom Menschen, Human- und Schweine-Plasmin sowie Subtilisin /228/. Die Egline konnten mittels klassischer Verfahren wie Gelchromatographie und Ionenaustauschchromatographie von den anderen Inhibitoren abgetrennt und in homogener Form erhalten werden. Die dafür verwendete Isolierungsprozedur ist in Abbildung 15 skizziert; als Maß für die Inhibitoraktivität diente ausschließlich die Chymotrypsinhemmung (mIU, Substrat N^{α}-Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid (SucPheNHNp)), siehe Tabelle 16 /230,227/.

Abb. 15: Isolierung der Egline nach Seemüller et al. /230,227/



* Hemmaktivität gegen Trypsin, Plasmin und Spuren eines Hemmstoffes gegen Chymotrypsin, Subtilisin und Granulozytenproteasen

** Thrombinhemmaktivität

*** Hemmaktivität gegen Chymotrypsin (angegeben sind /mU Chymotrypsinaktivität), Subtilisin, Elastase und Kathepsin G

\# Spuren von Inhibitoren gegen Chymotrypsin und Elastase

\#\# Hauptfraktionen Eglin b und c (Gemisch)

Die Prüfung des Reinheitsgrades der Präparationen von Eglin b und Eglin c mittels Disk-Elektrophorese (bei pH 8,9 und 4,3), SDS-Elektrophorese, isoelektrischer Fokussierung und durch die Bestimmung der terminalen Aminosäuren sowie der Aminosäurezusammensetzung ergab homogene Präparate /227/.

Tab. 16: Zusammenstellung der Eglin-Isolierung bezüglich Ausbeute und spezifischer Aktivität der Eglinfraktionen nach Seemüller. Gemessen wurde die Chymotrypsinhemmung mittels des Substrates SucPheNHNp /230,227/.

Isolierungsschritt	Fraktion	Spez.Aktivität [mIU/mg]	Ausbeute [%]
	Roh-Hirudin	5,5	
Gelfiltration an Sephadex G-75	II	15,5	85
Chromatographie an DEAE-Cellulose	II b,c	74	73
Chromatographie an SP-Sephadex	Eglin b	115	
	Eglin c	120	68

2.4.2 Charakterisierung der Egline

Bei der Darstellung der Egline wurden multiple Formen, sog. Isoinhibitoren isoliert, die in ihren biochemischen und inhibitorischen Eigenschaften identisch sind. Das aus der Aminosäurezusammensetzung ermittelte Molekulargewicht beträgt für Eglin b 8 073 und für Eglin c 8 099. Die Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Elektrophorese gab Werte um ca. 6 500 /227,228/.

Die beiden Hauptkomponenten unterscheiden sich nur in einer Aminosäure: Eglin b enthält ein zusätzliches Histidin und

Eglin c ein zusätzliches Tyrosin (s. Abschnitt 2.4.2.1/2). Der N-Terminus und die C-terminale Sequenz beider Isoinhibitoren sind identisch. In der elektrophoretischen Mobilität differieren sie aufgrund des Unterschiedes in der Aminosäurezusammensetzung voneinander: Der isoelektrische Punkt von Eglin b liegt bei 6,6 +/- 0,3 und für Eglin c bei 6,45 +/- 0,3 /227/.

Die Egline weisen ein ungewöhnliches Strukturmerkmal auf: Sie enthalten kein Cystein bzw. Cystin und somit keine Disulfidbrücken. Bisher sind nur 2 weitere disulfidbrückenfreie Inhibitoren bekannt, der Proteinase B-Inhibitor aus Hefe und der Alpha 1-Proteinaseinhibitor des Plasmas. Infolge des Fehlens von Cystinresten kann die Tertiärstruktur solcher Moleküle nicht durch Disulfidbrücken stabilisiert werden; dazu sind vermutlich hydrophobe Interaktionen zwischen benachbarten Aminosäuren innerhalb des Moleküls verantwortlich /228,227,230/.

Bemerkenswert ist auch die hohe Stabilität der Egline. In einem weiten pH-Bereich und beim Erwärmen auf 80° C für 10 min wurde kein Aktivitätsverlust registriert /227/.

2.4.2.1 Aminosäurezusammensetzung von Eglin b und c

Zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzungen wurden die Egline mit 6 N Salzsäure bei 110° C 20, 40 und 72 h im Vakuum hydrolysiert und die Proteinbausteine im Aminosäureanalysator analysiert /227/.

Nach Oxidation mit Perameisensäure konnten weder Cysteinsäure noch Methioninsulfon nachgewiesen werden. Das Fehlen von Cystein- bzw. Cystinresten wurde durch das Verhalten des Inhibitors nach selektiver chemischer Modifikation (Reduktion und Carboxymethylierung) bestätigt. Die modifizier-

ten Egline wiesen die gleiche Inhibitoraktivität und Aminosäurezusammensetzung wie die nativen Hemmstoffe auf; auch ihre elektrophoretische Mobilität in der Disk-Elektrophorese war identisch /227/.

Eine neu entwickelte, empfindliche und sehr ökonomische Analysenmethode basiert auf der Identifizierung von Aminosäuren mit Hilfe von Dimethyl-aminoazobenzol-sulfonylchlorid (DABS-Cl). Mit diesem Verfahren wurde die Zusammensetzung des Eglin c ermittelt: Sie differierte im Vergleich zur konventionellen Methode nur um eine Aminosäure (siehe Tabelle 17) /114/.

Außer Cystein bzw. Cystin enthalten die Egline auch kein Methionin und Isoleucin; die Aminosäuren Valin, Tyrosin und Phenylalanin liegen dagegen in relativ hoher Menge vor /227/.

2.4.2.2 Endgruppen

a) Für Eglin b und Eglin c wurde als N-Terminus die Aminosäure Threonin ermittelt. Die Bestimmung erfolgte nach Dansylierung durch Identifizierung der Dansylaminosäuren mittels Dünnschichtchromatographie /227/.

b) Die C-terminale Sequenz -Val-Gly-COOH ist für beide Fraktionen b und c ebenfalls identisch; sie wurde durch enzymatischen Abbau mittels Carboxypeptidase Y ermittelt. Hierzu wurden die Egline in einem Puffer aus 0,05 M Pyridinacetat/0,5% SDS, pH 6,0 gelöst und mit Carboxypeptidase Y im Molverhältnis 1 : 500 (Carboxypeptidase/Eglin) bei 25° C inkubiert /227/.

Tab. 17: Aminosäurezusammensetzungen der Egline in mol Aminosäure pro mol Inhibitor /227,229,114/.

	Eglin b		Eglin c		
Hydrolysezeit	72 h	extra-poliert	72 h	extra-poliert	DABS-Cl
Asparaginsäure	6,70	7	6,70	7	7,3
Threonin	4,07	5	4,08	5	4,6
Serin	2,48	3	2,31	3	2,8
Glutamin	7,17	7	7,11	7	6,8
Prolin	6,49	6	6,22	6	6,2
Glycin	5,19	5	5,27	5	4,9
Alanin	1,32	1	1,17	1	0,9
Cystin *	-	-	-	-	-
Valin	10,64	11	10,84	11	10,7
Methionin *	-	-	-	-	-
Isoleucin	-	-	-	-	0,2
Leucin	4,71	5	4,83	5	5,2
Tyrosin	3,78	4-5	4,61	5-6	4,8
Phenylalanin	4,89	5	4,93	5	5,3
Histidin	3,47	4	3,26	3	3,4
Lysin	2,30	2	2,23	2	2,4
Arginin	3,71	4	3,84	4	4,2
Tryptophan **	0,62	0	0,72	0	
Gesamtzahl		70		70	
Molekulargewicht		8 073		8 099	
N-Terminus	Thr		Thr		
C-Terminus	Gly		Gly		

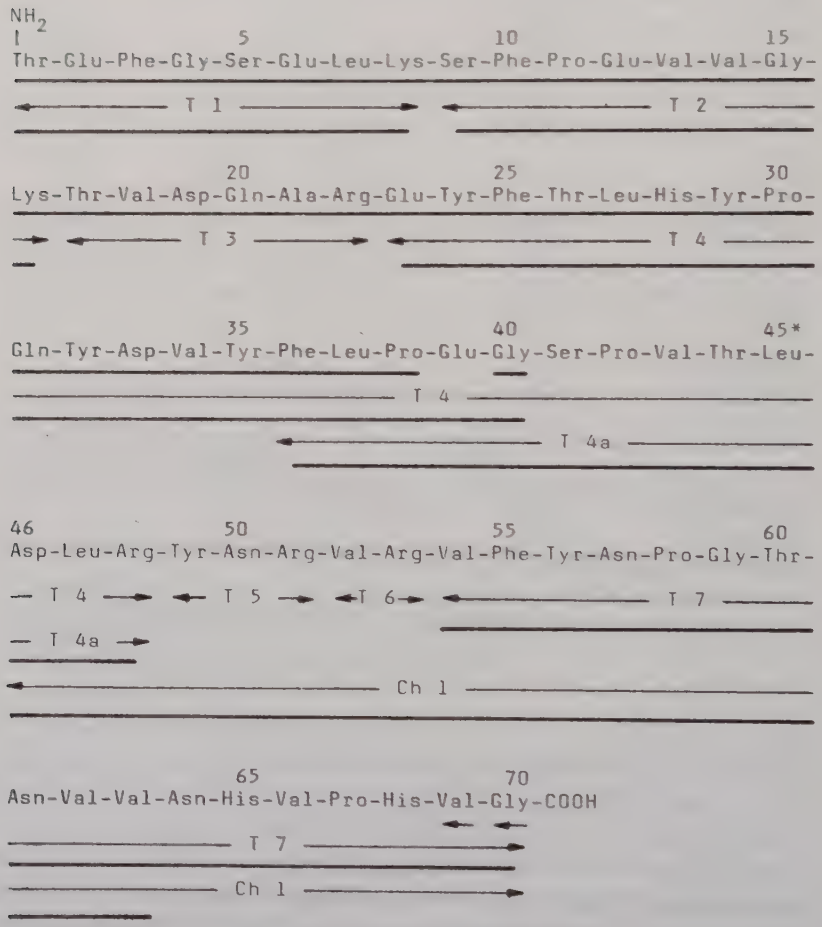
* nach Perameisensäureoxidation: 0
** photometrische Bestimmung; aus der Sequenz: 0

2.4.2.3 Primärstruktur von Eglin c

Zur Sequenzanalyse verwendeten Seemüller et al. /229,227/ den Wirkstoff Eglin c, der in größeren Mengen im Rohextrakt vorlag. Der sequentielle Abbau nach Edman des nativen Proteins und der nach tryptischer und chymotryptischer Proteolyse entstandenen Peptide erfolgte im Beckman-Sequenator. Die vollständige Sequenz ist in Abbildung 16 dargestellt.

Abb. 16: Aminosäuresequenz des Eglin c /228,229/.

Die Sequenzermittlung erfolgte mittels mikrotechnischer Verfahren:
a) Aminosäureanalyse mit DABS-Cl;
b) Identifizierung mit Dimethyl-aminoazobenzol-isothiocyanat (DABITC);
c) automatischer Abbau nach Edman /114,283/.



———	Sequenzierungslauf mit nativem Eglin c (Abbau nach Edman)
T 1-T 7	tryptische Peptide
Ch 1	chymotryptisches Peptid
← ←	C-terminaler Abbau mit Carboxypeptidase Y
*	die Hemmspezifität bestimmender Rest im reaktiven Zentrum

Die erhaltenen Phenylthiohydantoin(PTH)-Aminosäuren wurden mittels Gas- und Dünnschichtchromatographie sowie teilweise durch Rückhydrolyse der PTH-Aminosäuren mit 57%iger Jodwasserstoffsäure und darauffolgender Aminosäureanalyse identifiziert und bis Position 31 determiniert /229,227/.

Durch tryptischen Abbau des nativen Inhibitors gelang die weitere Aufklärung der Aminosäuresequenz. Für diese enzymatische Proteolyse wurde das verwendete Trypsin aus Schweinepankreas zur Ausschaltung restlicher chymotryptischer Aktivität mit N-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon (TPCK) vorbehandelt; trotzdem ließ sich aus dem tryptischen Inkubationsansatz ein Peptid isolieren, das durch Spaltung der Bindung Phe-Tyr in Position 35-36 entstanden sein mußte /227/.

Wie bereits erwähnt, weist Trypsin eine hohe Spaltungsspezifität auf; es hydrolysiert nur Peptidbindungen basischer Aminosäuren. Die tryptischen Peptide aus dem Inkubationsansatz (Eglin und Trypsin in 0,01 M Calciumchloridlösung, pH 8,1, 25° C) wurden mittels Gelchromatographie an Biogel P 30 in 50%iger Essigsäure vorgetrennt und die erhaltenen Peptide durch Rechromatographie (Biogel P 6 und P 2, SP-Sephadex C 25) weiter gereinigt. Alle Peptide wurden mit Hilfe eines automatischen Analysators sequenziert und die PTH-Aminosäuren mit den oben angegebenen Methoden identifiziert /229,227/.

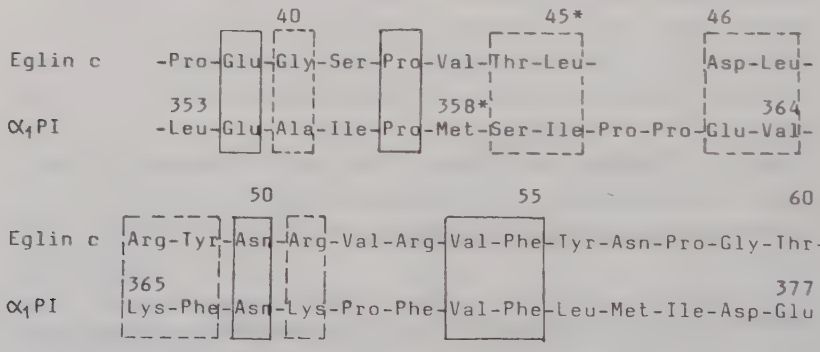
Die Sequenz der Positionen 48-53 wurde auch nach chymotryptischem Abbau des Eglin c determiniert. Durch Inkubation (90 min, 20° C) des Inhibitors bei pH 7,5 mit 56 mol% Chymotrypsin, das mit N-p-Tosyl-L-lysyl-chloromethan (TLCK) vorbehandelt wurde, entstanden chymotryptische Peptide. Die Trennung des Gemisches über Sephadex G-50 (0,1 M Essigsäure) ergab 3 Hauptfraktionen: den Eglin-Chymotrypsin-Komplex, natives Eglin c und ein Peptid. Die eluierten Fraktionen wurden auf ihre chymotryptische und antichymotryptische Aktivität getestet, das Peptid mittels Dünnschichtchromatographie

isoliert und als C-terminales Fragment des Eglin c (Positionen 46-70) identifiziert /228,229/.

Die Homogenität der Peptide wurde durch Bestimmung des N-Terminus und Aminosäureanalyse überprüft /229/.

Homologien in der Sequenz fanden sich u.a. zwischen Eglin und dem Plasmaprotein Alpha 1-Proteinaseinhibitor. Beide Inhibitoren sind in ihrem Hemmspektrum und möglicherweise auch in ihrem Hemmechanismus ähnlich. In Abbildung 17 wird die Eglinsequenz der Sequenz des Alpha 1-Proteinaseinhibitors (α_1PI) im Bereich der reaktiven Zentren gegenübergestellt /227/.

Abb. 17: Sequenzhomologien zwischen Eglin und Alpha 1-Proteinaseinhibitor



2.4.3 Wirkspektrum der Egline

Die Egline sind starke Inhibitoren des Chymotrypsins, Subtilisins und der menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G. Gegenüber Rinder-Trypsin, Schweinepankreas-Elastase und Eber-Akrosin besitzen sie nur eine schwache Hemmaktivität (siehe Tabelle 18). Der Inhibitor Eglin reagiert mit dem jeweiligen Enzym im äquimolaren Verhältnis zum inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplex /228/.

Chymotrypsin ist eine wichtige Serinprotease des Verdauungstraktes. Seine inaktive Vorstufe, das Chymotrypsinogen, wird im Pankreas gebildet, gespeichert und in den Dünndarm sezerniert, wo es durch tryptische und autokatalytische Spaltung aktiviert wird /234/. Chymotrypsin spaltet bevorzugt Phenylalanyl-, Tyrosyl-, Tryptophanyl- und Leucyl-Peptidbindungen. Sein pH-Optimum liegt bei 7,8 und das Molekulargewicht beträgt 25 000 /109/. Die Hemmwirkung des Eglins gegenüber Chymotrypsin wird in Absatz 2.4.3.1 im Zusammenhang mit dem Hemmechanismus behandelt.

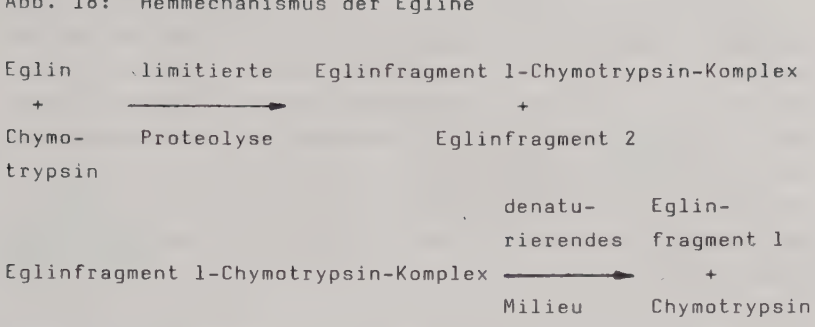
Subtilisin ist eine von Bacillus subtilis und verwandten Bakterienarten gebildete alkalische Serinprotease mit einem Molekulargewicht von ca. 27 000. Diese Serinprotease enthält in ihrem katalytisch aktiven Zentrum die Aminosäuren Threonin, Serin und Methionin /234/ und differiert somit in der Aminosäuresequenz um den reaktiven Serinrest (-Gly-Thr-Ser* 221-Met-Ala-) /235,234/ von den Serinproteasen des Pankreas (-Gly-Asp-Ser* 195-Gly-Gly-) /234/. Zwischen Subtilisin und den Pankreasenzymen bestehen trotz ähnlicher Substratspezifität und ähnlichem katalytischen Mechanismus erhebliche strukturelle Unterschiede /109,235/. Subtilisin wird häufig bei der Sequenzanalyse niedermolekularer Peptide eingesetzt.

2.4.3.1 Hemmechanismus - Interaktion mit Chymotrypsin

Im Detail wurde die Interaktion des Eglins mit Chymotrypsin untersucht. Aufgrund fehlender Disulfidbrücken in der Primärstruktur der Egline war die Aufklärung des Reaktionsmechanismus, der der Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes zugrunde liegt, im Vergleich zu anderen Proteinaseinhibitoren von besonderem Interesse.

Die Komplexbildung der Egline mit Chymotrypsin findet bei bestimmten experimentellen Bedingungen unter Abspaltung eines C-terminalen Peptidfragmentes (Eglinfragment 2) aus dem Inhibitormolekül durch limitierte Proteolyse der Peptidbindung Leu 45-Asp 46 statt; das verbleibende Eglinfragment 1 ist nach Freisetzung aus dem Komplex unter denaturierenden Bedingungen inhibitorisch inaktiv /227,228/. Eine Resynthese des Eglinmoleküls aus den beiden Fragmenten 1 und 2 in Gegenwart des Enzyms ist vermutlich aus energetischen Gründen nicht möglich, d.h. die Bildung des Acyl(Fragment 1)-Enzym-Komplexes ist in diesem Falle eine irreversible Reaktion. Allerdings haben sich inzwischen Hinweise ergeben, daß die Freisetzung von Fragment 1 aus dem Komplex nur unter denaturierenden Bedingungen zu erfolgen scheint. Es ist aus diesem Grunde nicht auszuschließen, daß für den Übergang eines primären, intermediären und reversiblen Eglin-Enzym-Komplexes in den irreversiblen Acyl-Enzym-Komplex ebenfalls denaturierende Bedingungen (z.B. die Gegenwart von Natriumdodecylsulfat während der Elektrophoresen) ausschlaggebend sind. Die primäre Bildung eines reversiblen Komplexes analog dem allgemeinen Reaktionsmechanismus von Protein-Proteinase-Inhibitoren ist deshalb auch im Falle der Egline denkbar (siehe Abbildung 18) /6/.

Abb. 18: Hemmechanismus der Egline



Die Inkubation von Eglin c mit verschiedenen Enzymkonzentrationen (5, 50 und 90 mol%) bei pH-Werten von 7,8 und 3,0 (für 5 min; 2, 24 und 48 h) ließ eine deutliche Abhängigkeit der Hemmaktivität des Inhibitors von der Inkubationsdauer, dem pH-Wert des Puffermilieus und dem molaren Enzym-Inhibitor-Verhältnis erkennen. Im schwach alkalischen Milieu wurde eine konstant starke Hemmaktivität gemessen, im sauren Bereich jedoch eine starke Abnahme der Hemmaktivität durch Dissoziation des Eglin-Chymotrypsin-Komplexes verzeichnet. Der Komplex dissoziierte bei pH 3,0 in ein inhibitorisch inaktives Eglinfragment und in aktives Chymotrypsin, das wiederum mit nativem Eglin zum Komplex reagierte. Bei hohen Enzymkonzentrationen (90 mol%) fand auch im schwach alkalischen Milieu die Dissoziation des Komplexes und, damit verbunden, ein Eglinabbau statt /229,227/.

2.4.3.2 Inhibitorwirkung gegen die Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G

Elastase und Kathepsin G sind Proteinasen aus den lysosomalen Granula der menschlichen polymorphkernigen Granulozyten. Diese Enzyme liegen in den Lysosomen in aktiver Form vor und können phagozytiertes extrazelluläres und intrazelluläres

Material sofort abbauen. Werden solche Enzyme bei entzündlichen Reaktionen aus der Zelle freigesetzt, so werden sie von den Inhibitoren Alpha 1-Proteinaseinhibitor, Alpha 2-Macroglobulin, Alpha 1-Antichymotrypsin und HUSI-I (einem Hemmstoff in mukösen Sekreten wie Seminalplasma, Bronchialsekret und Cervix uteri-Sekret /1,47,214/) inaktiviert; die gebildeten Enzym-Inhibitor-Komplexe werden über das retikuloendotheliale System (RES) phagozytiert und eliminiert /101, 193,180/.

Eine unkontrollierte Freisetzung dieser lysosomalen Proteinasen wurde bei bakteriellen Allgemeininfektionen wie der Septikämie oder dem septischen Schock /1,39/ sowie bei Leukämien /40/ nachgewiesen. In solchen Fällen werden u.U. die schützenden endogenen Inhibitoren zu sehr verbraucht, so daß die Granulozytenenzyme durch unspezifische Proteolyse den Abbau diverser extrazellulärer Faktoren bewirken können, z.B. von Gerinnungsfaktoren /216,1,39,180,40,9/, Immunglobulinen (u.a. IgG) /236/, Elastin und Kollagenfasern /10,26/ und von Antithrombin III /102/. Klinische und experimentelle Untersuchungen bestätigten, daß diese pathophysiologischen Mechanismen an der Pathogenese von Koagulopathien /216,1, 101,236,181,219,39,40/, der Destruktion von Gelenkknorpelsubstanz bei rheumatoider Arthritis /10,195,100/ und der Entstehung des Lungenemphysems durch Abbau des Lungengewebes /100,216/ mitverantwortlich sind.

Mittels SDS-Elektrophorese wurde für die menschlichen Granulozytenproteasen Elastase ein Molekulargewicht von ca. 34 500 und für Kathepsin G von ca. 25 000 ermittelt /214, 216/. Beide Enzyme bilden sehr stabile Komplexe mit dem Eglin (siehe Hemmkonstanten in Tabelle 18).

Tab. 18: Hemmspektrum und Inhibitionskonstanten (Dissoziationskonstanten K_i des Enzym-Inhibitor-Komplexes in mol/l) von Eglin b und Eglin c nach Seemüller /227/

Proteinase	Hemmung	K_i [mol/l]x10^{10} Eglin b	Eglin c
Chymotrypsin (Rind)	++	2,2	4,2
Elastase aus Granulozyten (Mensch)	++	2,2	0,99
Kathepsin G aus Granulozyten (Mensch)	++	3,2	1,8
Subtilisin	++	1,5	1,2
Trypsin (Rind)	(+)		
Elastase aus Pankreas (Schwein)	(+)		

++ sehr starke Hemmung (+) schwache Hemmung

2.4.4 Potentielle Anwendungsbereiche für die Egline

Schon 1896 propagierten Bosc und Delezenne die entzündungsmindernde Wirkung von Blutegelextrakten, die auf einer Erhöhung der direkten phagozytären Kraft und Stimulation der Leukozyten zu Ausscheidungen beruhe. Die Egelextrakte seien somit in der Lage, die bakterizide Aktivität des Serums zu steigern. Die Autoren zeigten im Tierexperiment, daß Hunde nach Hirudinisierung in vivo Streptokokken- und Bact. coli-Infektionen überstanden /19/.

Dieser seit langem bekannte antiphlogistische Effekt der Hirudinextrakte wird neuerdings zumindest teilweise den Eglinen zugeschrieben /47/.

Die Egline gehören zu den stärksten bekannten Inhibitoren der neutralen Granulozytenproteasen. Ihr potentieller protektiver Effekt wurde durch in vitro Untersuchungen überzeugend belegt. Für die therapeutische Anwendung bei lokalen und generalisierten Entzündungen scheint der Hemmstoff besonders geeignet zu sein /47/.

Der Einsatz eines dem Eglin hinsichtlich des Hemmspektrums ähnlichen Protein-Proteinase-Inhibitors bei experimentell induzierten Endotoxinämien in der Frühphase verhinderte oder verminderte die postulierte destruktive Wirkung der Granulozytenenzyme auf Gerinnungs- und andere Plasmafaktoren, sowie die Inaktivierung von Antithrombin III /101,199,102/.

In vitro-Versuche über die inhibitorische Wirkung der Egline auf die signifikant erhöhte kollagenolytische Aktivität bei der Enteritis regionalis Crohn ergaben eine über 50%ige Minderung dieser proteolytischen Aktivität durch den Inhibitor /8,227/.

Die Ergebnisse der bisherigen in vitro- und in vivo-Studien zeigen, daß außer dem Hirudin auch das Eglin ein geeigneter Kandidat zur Therapie entzündlicher Erkrankungen sein dürfte; allerdings sind vor der klinischen Anwendung dieses Inhibitors noch entsprechend ausführliche toxikologische und pharmakologische Untersuchungen erforderlich. Die soeben geglückte gentechnologische Herstellung von Eglin stellt eine solide Basis für zukünftige Studien dar.

3. Zusammenfassende Darstellung

Viele Jahrhunderte wurden in der Heilkunde bei den mannigfaltigsten Krankheiten Blutentziehungen durch Blutegelanwendungen durchgeführt. Erst mit Einführung der Asepsis Anfang des 20. Jh. trat diese Behandlungsform ganz in den Hintergrund. Die Bemühungen gingen nun dahin, die aktiven Substanzen des Hirudo medizinalis zu isolieren.

Im Jahre 1884 wies Haycraft /85/ eine gerinnungshemmende Aktivität in wäßrigen Blutegelextrakten und 1894 Sahli /211/ eine antithrombotische Wirkung intravenös injizierter Egelauszüge im Tierexperiment nach. Diese Beobachtungen regten verschiedene Arbeitskreise an, die in den Peripharyngealdrüsen des Blutegels gebildete aktive Substanz zu isolieren, chemisch zu charakterisieren und ihren Angriffspunkt im Gerinnungssystem aufzuklären. Jacobj (1904) /99/ nannte den gerinnungshemmenden Wirkstoff "Hirudin". Er war bis zur Entdeckung des Heparins durch McLean im Jahre 1916 /266/ das einzige bekannte Antikoagulans, das weder die Zusammensetzung noch die Beschaffenheit des Blutes veränderte, jedoch in sehr kleinen Mengen wirksam war.

Erst im Jahre 1955 gelang es Markwardt /148,144/, aus Blutegelköpfen ein elektrophoretisch und chromatographisch homogenes Hirudin herzustellen und chemisch zu charakterisieren /156/. Es handelte sich um ein aus 65 Aminosäuren aufgebautes Polypeptid, das dann auch in anderen Arbeitskreisen näher untersucht wurde /12,4,14,135,198/. Als N-terminale Aminosäure des Inhibitormoleküls Hirudin identifizierten de la Llosa et al. /135/ Leucin bzw. Isoleucin; Markwardt et al. /171/ sowie Baskova et al. /12/ bestätigten dieses Ergebnis, während Graf et al. /69/ und Petersen et al. /198/ in ihren Hirudinpräparaten aus ganzen Egeln Valin als N-Terminus ermittelten. Als C-Endgruppierung determinierten Jutisz et al. /136/ die Sequenz -Ala-Gly-Ser-Glu(NH_2)-Leu(OH), hin-

gegen ermittelten Petersen et al. /198/, Chang /24/ und Dodt et al. /33/ als C-terminale Sequenz -Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

Aufgrund der differierenden N-Termini schlossen Petersen et al. /198/ auf die Existenz von zwei Isoformen des Hirudins, i.e. einer Isoleucin- und einer Valinform. Baskova und Cherkesova /12,26/ hingegen sahen aufgrund ihrer vergleichenden Untersuchungen über Hirudine aus Egelköpfen und -körpern sowie ganzen Blutegeln die Ursache der unterschiedlichen Endgruppen in der Anwendung von verschiedenem Ausgangsmaterial /12/. Die Valinform ordneten Cherkesova et al. einer inaktiven aber hirudinähnlichen Substanz des Egelkörpers, genannt Pseudohirudin, zu. Nach ihrer Auffassung liegt in Präparaten aus ganzen Egeln diese inaktive Komponente in beträchtlicher Menge vor. Sie vermuteten, daß Pseudohirudin ein Stoffwechselprodukt des Hirudins ist und durch Abspaltung eines Polypeptidfragmentes aus dem Hirudinmolekül entsteht /14,26/; denn Pseudohirudin weist im Vergleich zum Hirudin einen geringeren Gehalt an Asparagin- und Glutaminsäure sowie an Lysin, Isoleucin und Tyrosin auf; es besitzt auch nur eine Disulfidbrücke /268,14/.

Die errechneten Werte für das Molekulargewicht des Hirudins liegen zwischen 7 000 (monomere Form) und 15 000 (dimere Form) /14,254,163,258,5,4/.

Die Primärstruktur des Hirudins

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-
Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-
Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-
Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-
Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-TyrSO_3H-Leu-Gln

wurde 1976 von Petersen et al. /198/ partiell aufgeklärt und neuerdings von Dodt et al. (1983) bestätigt /33/ und durch

Ermittlung der bis dahin noch unklaren Sequenz zwischen Position 50 und 56 vervollständigt.

Meßbare Hirudinkonzentrationen im Blut wurden bislang nur bei parenteraler Zufuhr des Inhibitors erreicht. Nach i.v. Applikation beträgt seine Halbwertzeit ca. 50-60 min; 70-80% des Hirudins werden in chemisch unveränderter Form im 24-Std.-Harn ausgeschieden /155,151,158,157/. Reines Hirudin zeichnet sich durch eine äußerst geringe Toxizität aus. Beobachtete Nebenwirkungen sind auf Begleitstoffe, vorwiegend Eiweißkörper und ihre Abbauprodukte, in den Präparaten zurückzuführen /63,267,150,158/.

Hirudin ist ein spezifischer Thrombininhibitor. Thrombin katalysiert in der Gerinnungskaskade nicht nur die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin, es ist auch an mehreren anderen Aktivierungsvorgängen ursächlich beteiligt. Durch detaillierte Untersuchungen wurde der hemmende Einfluß des Hirudins auf die einzelnen Reaktionsabläufe gezeigt /139,30, 155,268,203,196,186,187,256,116,151,153,31,103,25,257,107/.

Thrombin und Hirudin bilden einen stöchiometrischen Enzym-Inhibitor-Komplex, der eine Dissoziationskonstante K_i von 82 pmol/l besitzt. Der Ip des Komplexes liegt bei pH 4,3 /157,145/.

Die inhibitorische Aktivität des Hirudins wird in Antithrombineinheiten (AT-E/mg) angegeben. 1 AT-E ist die Hirudinmenge, die notwendig ist, um 1 NIH-E Thrombin in ihrer enzymatischen Aktivität gegenüber Fibrinogen zu blockieren /148, 169,255/.

Das reinste von Markwardt hergestellte Hirudin hat eine spezifische Hemmaktivität von 11 600 AT-E/mg. Die Hemmung der Enzymaktivität durch Hirudin konnte in einem weiten pH-Bereich mit Hilfe des synthetischen Substrates TAME analysiert werden. In höheren Konzentrationen verdrängte TAME Hirudin aus seinem Komplex mit Thrombin /266,168,155,169/.

Legaz und Davie /30/ fanden eine Hemmaktivität des Hirudins gegenüber Faktor IXa, der jedoch in Gegenwart von Faktor VIII, Ca^{++} und Phospholipid gegen die Inhibitorwirkung des Hirudins geschützt war /119/. Sie stellten fest, daß das Enzym mit dem Inhibitor einen Komplex im äquimolaren Verhältnis bildet. Kisiel und Hanahan /111/ beschreiben auch eine Komplexbildung von Hirudin mit Intermediat 2, einer inaktiven Vorstufe des Thrombins.

Zur Klärung des molekularen Reaktionsmechanismus zwischen Enzym und Inhibitor wurde u.a. der Einfluß chemischer Modifikationen am Enzym- bzw. Inhibitormolekül auf desses Fähigkeit zur Komplexbildung untersucht. So ergab sich beispielsweise, daß die Veresterung der freien Carboxylgruppen des Hirudinmoleküls und die Spaltung der Disulfidbrücken durch Oxidation mit einem praktisch vollständigen Verlust der Inhibitoraktivität einhergehen /155,255,266/. Es wurde auch die Reaktionsfähigkeit von nativem Hirudin mit modifiziertem Thrombin (Esterase-Thrombin und DIP-Thrombin) untersucht: Hirudin zeigte keine Affinität zum Esterase-Thrombin, seine Bindungsfähigkeit zum katalytisch inaktiven DIP-Thrombin war jedoch nicht eingeschränkt /266,169/.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß der katalytisch aktive Bereich des Thrombins im Komplex mit Hirudin zwar abgeschirmt, aber für die Bindung des Inhibitors an das Enzym nicht entscheidend ist; vermutlich finden an mehreren Bindungstellen Wechselwirkungen statt. Hier unterscheidet sich das Hirudin offensichtlich von anderen natürlichen Protein-Proteinase-Inhibitoren, die mit dem reaktiven Serinrest des aktiven Zentrums des Enzyms in Wechselwirkung treten /266,268,17,158/.

Detailliertere Kenntnisse über das reaktive Zentrum des Hirudinmoleküls liegen noch nicht vor. Die strukturelle Homologie zu anderen Naturstoffen, die eine spezifische Affinität zum Thrombin besitzen, führte zu der Annahme, daß das

Hirudinsegment Thr 45-Pro 46-Lys 47-Pro 48 eine selektive Bindungsaffinität zum Thrombin aufweist /198,125,24/.

Eine weite Verbreitung fand die Anwendung des Hirudins zu gerinnungsphysiologischen und gerinnungsdiagnostischen Untersuchungen. Da die Reaktion zwischen Enzym und Inhibitor nach stöchiometrischen Gesetzen abläuft, sind rasche quantitative Bestimmungen des Thrombins /150,147,155/, Prothrombins /172/ und Hirudins /145/ mittels Titration möglich. Der "Hirudintest" /220/ wurde als Mikromethode zur Kontrolle des Prothrombinspiegels bei Antikoagulantientherapie vom Dicumarol- oder Indandion-Typ propagiert. Mit dem "Hirudintoleranztest" /152/ konnten Gerinnungsstörungen verifiziert und differenziert /272,206,275,271/ sowie Antikoagulantientherapien überwacht werden /15/. Verschiedene Autoren verwendeten Hirudin als spezifisches Antikoagulans für Untersuchungen über Thrombozytenfunktionen /67,250,65,94,237,226,25,141, 121,92,93,273/ sowie zur selektiven Ausschaltung thrombininduzierter Vorgänge /191,201/ und zur Differenzierung von Effekten enzymatischer Begleitsubstanzen bei Substitutionstherapien /91,231/.

Die Ergebnisse vieler Studien demonstrieren den protektiven Effekt des Hirudins gegen Thrombosierungen bzw. die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) bei experimentell induzierter Gerinnungsneigung verschiedener Genese /83,190,165, 96,97,47/. Hierzu zählen z.B. Gefäßwandläsionen /151,153/, Strömungshindernisse, Endotoxinämien /84,77/, intravasale Anhäufung proteolytischer Enzyme oder durch Traumen freigesetzte prokoagulatorische Aktivität. Krankheitsbilder, die zu einer Hyperkoagulabilität bzw. Verbrauchskoagulopathie prädisponieren, sind u.a. die Abruptio placentae, Fruchtwasserembolien, nekrotisierende Tumoren, akute Leukämien, Hämolysen sowie alle Schock- und Sepsisformen /212,183,89,180, 197,84,189,90,181,28/.

Die Schutzwirkung des Inhibitors Hirudin gegen Mikrothrombenbildung manifestierte sich im Tierversuch in allen Orga-

nen. Es zeigte sich auch, daß die Anwendung des Hirudins gegenüber dem Heparin von Vorteil ist, da die Heparinaktivität an Antithrombin III, das bei der DIC verbraucht wird, gekoppelt ist. Außerdem weist der aus Thrombozyten freiwerdende Thrombozytenfaktor 4 eine Antiheparinwirkung auf und "neutralisiert" bzw. verbraucht somit ebenfalls Heparin /165,134,47/.

Den diversen Vorzügen des Hirudins gegenüber anderen Antikoagulantien (vgl. Kapitel 2.1.5.2) stehen seine begrenzte Verfügbarkeit und die rasche Eliminierung aus dem Organismus gegenüber. Aus diesen Gründen ist Hirudin derzeit besonders für die Anwendung bei solchen Fällen geeignet, die eine schnelle und kurzfristige Gerinnungshemmung, wie z.B. die Notfalldialyse /221/, erfordern /155,105/.

Behandlungserfolge durch intrakutane Hirudininjektionen wurden bei oberflächlichen Thrombophlebitiden beschrieben /63/. Die Effektivität lokaler Hirudinapplikationen ist jedoch umstritten /246,268/. Andererseits wurden durch die Anwendung hirudinhaltiger Salben nach Operationen an Großgelenken gute Erfahrungen in Bezug auf einen schnellen Rückgang der postoperativen Weichteilschwellung gesammelt /240/.

Später wurde festgestellt, daß mehrere Hirudin-Handelspräparate außer gegenüber Thrombin auch gegenüber Trypsin, Plasmin und Apha-Chymotrypsin hemmaktiv waren /57/..

1969 isolierten Fritz et al. aus käuflichen Hirudinpräparaten mit Hilfe eines wasserunlöslichen Trypsinharzes /53,48/ einen Trypsin-Plasmin-Akrosin-Inhibitor, der von R. Marx "Bdellin" genannt wurde. Das zunächst erhaltene Inhibitorgemisch konnte in zwei mit A und B benannte Hauptfraktionen aufgetrennt werden. Jede dieser Bdellinfraktionen ließ sich wiederum chromatographisch in mehrere Komponenten zerlegen. Das für Bdelline des Typs A ermittelte Molekulargewicht beträgt 7 000 und für Bdelline des Typs B 5 600 /54,56/.

Beachtliche Unterschiede zeigen die Bdelline A und B in ihren Aminosäurezusammensetzungen, insbesondere in der Anzahl der Disulfidbrücken. Bdellin B-3, der stärkste Inhibitor unter den Bdellinen, enthält weder Prolin noch Methionin, Isoleucin, Phenylalanin und Tryptophan /54/.

Krejci und Fritz (1975) /117/ determinierten eine partielle Primärstruktur des Bdellin B-3-Moleküls, das aus 46 Aminosäuren aufgebaut ist und mit einer Molekülmasse von 4 968 Dalton zu den kleinsten bisher bekannten Protein-Endoproteinase-Inhibitoren gehört:

Asp-Thr-Glu-Cys-Val-Cys-Thr-Lys-Glu-Leu-His-Arg-Val-Cys-
Gly-Ser-Asp-Gly-Val-Thr-Tyr-Asp-Asn-Glu-Cys-Leu-Ala-Cys-
(Asx,Thr,Ser,Glx,Glx,Glx,Gly,Gly,Ala,Ala,Ala,Val,His,His,
His,His,His,Cys)

Strukturanalysen zeigten umfassende Sequenzhomologien zwischen Bdellin B-3 und den pankreatischen sekretorischen Trypsin-Inhibitoren (PSTI, Kazal-Typ) /56,74,73,261/.

Intravenös an Ratten verabreichte Bdelline häuften sich kurzfristig in der Leber an; 46-93% der verabreichten Hemmaktivität wurden im 24-Std.-Harn ausgeschieden /58/.

Die Bdelline A und B gehören zu den sog. Lysin-Inhibitoren, da ihr reaktives Zentrum von einem Lysinrest gebildet wird /49,129/. Sie inaktivieren Trypsin, Plasmin und Akrosin unter Bildung eines äquimolaren und stabilen Komplexes /56, 52/. Bdellin B-3 zählt zu den potentesten Inhibitoren des Human-Akrosins. Die Dissoziationskonstante K_i des Akrosin-Bdellin B-3-Komplexes liegt unter 0,1 nmol/l /52/.

Die Bdelline A zeichnen sich durch eine ausgeprägte Hemmaktivität gegenüber Human-Plasmin aus /106/. Da in käuflichen Hirudinpräparaten neben Hirudin auch die Bdelline A und B enthalten sind, ist bei gerinnungsphysiologischen Studien

eine Überlagerung von thrombin- und plasminhemmender Aktivität zu beachten /56/.

Fritz et al. entdeckten in Hirudin-Handelspräparaten zusätzlich zu den beschriebenen Hemmaktivitäten eine weitere inhibitorische Wirkung gegenüber Alpha-Chymotrypsin. Danach isolierten Seemüller et al. (1977) /230/ aus Roh-Hirudin einen Inhibitor, genannt "Eglin", für Chymotrypsin, Subtilisin, Elastase und Kathepsin G aus Human-Granulozyten.

Auch hier wurden mehrere Formen, u.a. die sog. Isoinhibitoren Eglin b und c, isoliert, die jedoch in ihren biochemischen und inhibitorischen Eigenschaften identisch sind. Das für Eglin b bestimmte Molekulargewicht beträgt 8 073 und für Eglin c 8 099 /227,228/.

Die Egline stellen einen neuen Typ von Protein-Proteinase-Inhibitoren dar, da sie weder Cystein noch Cystin enthalten und somit keine Disulfidbrücken besitzen. Bemerkenswert ist, daß sie trotzdem sehr stabile Inhibitoren sind. Die Strukturen beider Eglinformen b und c unterscheiden sich nur durch den Austausch eines einzigen Aminosäurerestes: Eglin b enthält zusätzlich Histidin und Eglin c zusätzlich Tyrosin, wodurch die geringe Differenz ihrer isoelektrischen Punkte (Eglin b bei pH 6,6 und Eglin c bei pH 6,45) erklärbar ist. Der N-Terminus Threonin und die C-terminale Sequenz -Val-Gly-COOH sind für beide Formen identisch /227,229,114/.

Eglin c weist folgende Primärstruktur /227,228/ auf:

Thr-Glu-Phe-Gly-Ser-Glu-Leu-Lys-Ser-Phe-Pro-Glu-Val-Val-
Gly-Lys-Thr-Val-Asp-Gln-Ala-Arg-Glu-Tyr-Phe-Thr-Leu-His-
Tyr-Pro-Gln-Tyr-Asp-Val-Tyr-Phe-Leu-Pro-Glu-Gly-Ser-Pro-
Val-Thr-Leu-Asp-Leu-Arg-Tyr-Asn-Arg-Val-Arg-Val-Phe-Tyr-
Asn-Pro-Gly-Thr-Asn-Val-Val-Asn-His-Val-Pro-His-Val-Gly

Sequenzhomologien fanden sich im Bereich der reaktiven Zentren von Eglin und dem Plasmaprotein Alpha 1-Proteinaseinhibitor; beide Inhibitoren haben auch ein ähnliches Hemmspektrum /227/.

Enzym und Eglin bilden einen äquimolaren Enzym-Inhibitor-Komplex. Die Komplexierung findet bei geeigneten Bedingungen unter Abspaltung eines C-terminalen Eglinfragmentes durch limitierte Proteolyse der Peptidbindung Leu 45-Asp 46 statt. Diese Reaktion ist irreversibel. Nach Freisetzung aus dem Komplex ist das restliche Eglinfragment 1 inhibitorisch inaktiv, während das Enzymmolekül erneut mit einem nativen Eglinmolekül reagieren kann /229,227/. Die Egline sind starke Inhibitoren des Chymotrypsins, Subtilisins und der menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G, während sie gegenüber Rinder-Trypsin, Schweinepankreas-Elastase und Eber-Akrosin nur eine schwache Hemmaktivität ausüben /228/.

Der schon seit langem bekannte antiphlogistische Effekt von Blutegelextrakten wird zumindest teilweise den Eglinen zugeschrieben /47/. Ihre potentielle protektive Wirkung wurde durch mehrere Untersuchungen aufgezeigt /101,199,102,8,227/.

Da die Verfügbarkeit der Wirkstoffe des medizinischen Blutegels begrenzt ist, stehen diese natürlichen Protein-Proteinase-Inhibitoren für die medizinische Anwendung derzeit noch nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung. Die Gentechnologie eröffnet jedoch die Möglichkeit, diese Inhibitoren in Zukunft in genügender Menge herstellen zu können.

4. Literaturverzeichnis

1 Aasen, A.O., und K. Ohlsson, in: Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 359, 683 (1978)

2 Andersson, L., Haemostasis 1, 79 (1972)

3 Andrews, P., J. Biochem. 91, 222 (1964)

4 Bagdy, D., E. Barabas und L. Graf, Thromb. Res. 2, 229 (1973)

5 Bagdy, D., E. Barabas, L. Graf, T. Ellebaek, T. Petersen und S. Magnusson, in L. Lorand (Hrsg.), Methods in Enzymology, Bd. 45 B: Proteolytic Enzymes, S. 669, Academic Press, New York-London-San Francisco, 1976

6 Baici, A., und U. Seemüller, Biochem. J. 218, 829 (1984)

7 Bang, N.U., C.E. Mattler, P.J. Burk, C.A. Marks und R.E. Zimmmermann, Thrombos. Haemost. 42, 370 (1979)

8 Bary, S. von, Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Wundheilung des Dickdarmes unter besonderer Berücksichtigung der gewebeständigen Fibrinolyse und Kollagenolyse, Habilitationsschrift, Med. Fakultät der Universität München, 1979

9 Barnhart, M.I., Federation Proc. 24, 846 (1965)

10 Barret, A.J., in: K. Havemann und A. Janoff (Hrsg.), Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes, 385, Verlag Urban & Schwarzenberg, Baltimore-München, 1978

11 Barton, P.G., und E.T. Yin, in: R.M. Hochster, M. Kates und J.W. Quastel (Hrsg.), Metabolic Inhibitors, Bd. 4, S. 215, Academic Press, New York, London, 1973

12 Baskova, I.P., und D.U. Cherkesova, Biochimija 45, 195 (1980)

13 Baskova, I.P., D.U. Cherkesova und V.V. Mosolov, Biochimija 41, 774 (1976)

14 Baskova, I.P., D.U. Cherkesova, V.V. Mosolov, E.L. Malova und L.A. Belyanova, Biochimija 45, 348 (1980)

15 Besel, R.: Vergleichende Untersuchungen über 4 Toleranztests zur Diagnostik von Gerinnungsstörungen, Inaugural-Dissertation, Med. Akademie, Erfurt, 1967

16 Blobel, P.: Versuche über Transfusion mit dem vom Egel gesogenen Blute und über die Verwendung frisch bereiteten Egeldecoctes zur Transfusion, Inaugural-Dissertation, Med. Facultät Greifswald 1892

17 Blombäck, B.,in: M.F. Scully und V.V. Kakkar (Hrsg.), Chromogenic Peptide Substrates - Chemistry and Clinical Usage, S. 3, Churchill Livingstone-Edinburgh-London- New York, 1979

18 Bodong, A., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmak. 52, 242 (1904)

19 Bottenberg, H.: Die Blutegelbehandlung, Hippokrates-Verlag, Stuttgart-Leipzig, 1935

20 Brown, J.E., R.F. Baugh und C. Hougie, Thromb. Res. 17, 267 (1980)

21 Butzengeiger, O., Dtsch. Med. Wochenschrift, 713 (1931)

22 Caldwell, M.J., Thrombos. Diathes. haemorrhag. (Stuttgart) 17, 256 (1967)

23 Carlisle, T.L., D.V. Shah, R. Schlegel und J.W. Suttie, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1948, 140 (1975)

24 Chang, J.Y., Fed. of European Biochem. Societies 164/2, 307 (1983)

25 Chao, F.C., J.L. Tullis, G.S. Conneely und J.W. Lowler, Thrombos. Haemost. 35, 717 (1976)

26 Cherkesova, D.U., I.P. Baskova, V.V. Mosolov, N.A. Aldanova und N.A. Potapenko, Dokl. Acad. Nauk SSSR 241, 720 (1978)

27 Claeson, G., L. Aurell, G. Karlsson, S. Gustavsson, P. Friberger, S. Arielly und R. Simonsson, in: M.F. Scully und V.V. Kakkar (Hrsg.), Chromogenic Peptide Substrates - Chemistry and Clinical Usage, S. 20, Churchill Livingstone, Edinburgh-London-New York, 1979

28 Coe, N.P., und E.W. Salzman, Surg. Clin. Americ., 875 (1976)

29 Credo, R.B., M.J. Fasco und J.W. Fenton II, Fed. Proc. 35, 648 (1976)

30 Davie, E.W., K. Fujikawa, K. Kurachi und W. Kisiel, in: A. Meister (Hrsg.), Advances in Enzymology, Bd. 48 S. 277, John Wiley and Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto, 1979

31 Detwiler, T.C., und R.D. Feinman, Biochemistry 12, 282 (1973)

32 Dickinson, W.L., J. physiol. (London) 11, 566 (1890)

33 Dodt, J., H.P. Müller, U. Seemüller und J.Y. Chang, Fed. of European Biochem. Societies 165/2, 180 (1984)

34 Donaldson, V.H., und J. Kleniewski, Thromb. Res. 16, 401 (1979)

35 Downing, M.R., R.J. Butkowski, M.M. Clark und K.G. Mann, J. biol. Chemistry 250, 8897 (1975)

36 Ducuing, J., und C. Soula, Sang 2, 240 (1928)

37 Eagle. H., und T.N. Harris, J. gen. Physiol. 20, 543 (1937)

38 Egberg, N., und K. Bergström, in: M.F. Scully und V.V. Kakkar (Hrsg.), Chromogenic Peptide Substrates - Chemistry and Clinical Usage, S. 61, Churchill Livingstone, Edinburgh-London-New York, 1979

39 Egbring, R., und K. Havemann, in: K. Havemann und A. Janoff (Hrsg.), Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes, 442, Verlag Urban & Schwarzenberg, Baltimore-München, 1978

40 Egbring, R., W. Schmidt, G. Fuchs und K. Havemann, Blood 49, 219 (1977)

41 Engelhorn, Mediz. Welt, 1145 (1932)

42 Esnouf, M.P., in: L. Lorand (Hrsg.), Methods in Enzymology, Bd. 19, Proteolytic Enzymes, S. 715, Academic Press, New York-San Francisco-London, 1976

43 Fenton II.J.W., M.J. Fasco, A.B. Stackrow, D.L. Aronson, A.M. Young und J.S. Finlayson, J. biol. Chemistry 252, 3587 (1977)

44 Fink, E., G. Klein, F. Hammer, G. Müller-Bardorff und H. Fritz, in: H. Fritz und Tscheche (Hrsg.), Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors, München 1970, 225, Walter de Gruyter, Berlin, 1971

45 Firkin, B.G., A. Goh, M. Broadway und M. Howard, Thrombost. Haemost. 42, 20 (1979)

46 Franz, F., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 49, 342 (1903)

47 Fritz, H., Ciba Foundation 75 / Excerpta Medica, 351 (1980)

48 Fritz, H., B. Brey, M. Müller und M. Gebhardt, Proc. Int. Res. Conf. 1st Munich 1970, 28, de Gruyter, Berlin 1971

49 Fritz, H., E. Fink, M. Gebhardt, K. Hochstrasser und E. Werle, Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 350, 933 (1969)

50 Fritz, H., B. Förg-Brey, E. Fink, H. Schießler, E. Jaumann und M. Arnhold, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1007 (1972)

51 Fritz, H., B. Förg-Brey, M. Meier, M. Arnhold und H. Tschesche, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1950 (1972)

52 Fritz, H., B. Förg-Brey, H. Schießler, M. Arnhold und E. Fink, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1010 (1972)

53 Fritz, H., M. Gebhardt, E. Fink, W. Schramm und E. Werle, Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 350, 129 (1969)

54 Fritz, H., M. Gebhardt, R. Meister und E. Fink, in: H. Fritz und H. Tschesche (Hrsg.), Proc. Int. Res. Conf. Proteinase Inhibitors, S. 271, de Gruyter, Berlin-New York, 1971

55 Fritz, H., G. Hartwich und E. Werle, Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 345, 150 (1966)

56 Fritz, H., und K. Krejci, Methods of Enzymology 45, 797 (1976)

57 Fritz, H., K-.H. Oppitz, M. Gebhardt, I. Oppitz und E. Werle, Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 350, 91 (1969)

58 Fritz, H., K-.H. Oppitz, D. Meckl, B. Kemkes, H. Haendle, H. Schult und E. Werle, Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 350, 1541 (1969)

59 Fritz, H., und W.D. Schleuning, in: H. Fritz, H. Tschesche, L.S. Greene und E. Truscheit (Hrsg.), Proc. 2nd Int. Research Conference, S. 118, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974

60 Fritz, H., I. Trautschold und E. Werle, in: H.U. Bergmeyer (Hrsg.), Methoden der enzymatischen Analyse, 1105, Verlag Chemie, Weinheim, 1970

61 Fukui, T., Z. vergl. Physiol. 4, 201 (1926)

62 Fulton, A.J., und J. Dempster, C.R.M. Prentice, Thromb. Res. 15, 143 (1979)

63 Gabor, A., Deutsches Gesundheitswesen 21, 348 (1966)

64 Gabor, A., Deutsches Gesundheitswesen 22, 1595 (1967)

65 Ganguly, P., und W.J. Sonnichsen, Brit. J. Haematol. 34, 291 (1976)

66 Gladner, J.A., und K. Laki, Arch. Biochem. Biophysics 62, 501 (1956)

67 Glusa, E., und F. Markwardt, Haemostasis 9, 188 (1980)

68 Goodwin, T.W., und R.A. Morton, Biochem. J. 40, 628 (1946)

69 Graf, L., A. Pathy, E.B. Barabas und D. Bagdy, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 310, 416 (1973)

70 Gratia, A., Annales de lInstitut Pasteur 35, 513 (1921)

71 Gray, W.R., B.S. Hartley, Biochem. J. 89, 59 (1963)

72 Gray, W.R., Methods in Enzymology 11, 139 (1967)

73 Greene, L.J., und D.C. Bartelt in: Protides of Biological Fluids, 23 rd. Colloquim, Hrgs. H. Peeters, Pergamon Press, New York, p.p. 223, 1975

74 Guy, O., R. Shapanka und L.J. Greene, J. Biol. Chem. 246, 7740 (1971)

75 Habermann, E., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 236, 492 (1959)

76 Haendle, H., H. Fritz, I. Trautschold und E. Werle, Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 343, 185 (1965)

77 Hafter, R., G. Müller-Berghaus, R. v. Hugo und H. Graeff, Thromb. Res. 10, 711 (1977)

78 Hager, in: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis 5, 85 (1976)

79 Hall, W.M., und P. Ganguly, J. cellular Biol. 85, 70 (1980)

80 Hankin, E.H., J. Brit. Med., 65 (1890)

81 Hartley, B.S., Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B 257, 77 (1970)

82 Hauptstein, P., Mediz. Welt, 1723 (1934)

83 Haustein, K.O., und F. Markwardt, Thrombos. Diathes. haemorrhag. (Stuttgart), 13, 60 (1965)

84 Haustein, K.O., und F. Markwardt, Folia Haematol., Leipzig 97, 104 (1972)

85 Haycraft, J.B., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 18, 209 (1884)

86 Hempel, C., Mediz. Welt, 210 (1934)

87 Henschen, C., Arch. Klin. Chirurgie 152, 103 (1928)

88 Herzig, R.H., O.D. Ratnoff, J.R. Shainoff und J. Lab. clin. Med. 76, 451 (1970)

89 Hiemeyer, V., H. Rasche und K. Diehl: Hämorrhagische Diathesen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1972

90 Hiller, E., J.G. Saal, P. Ostendorf und G.W. Griffiths, Klin. Wschr. 55, 751 (1977)

91 Hofmann, V., M. Ermanni und P.W. Straub, Thrombos. Haemost. 42, 64 (1979)

92 Holme, R., R. Oftebro und T. Hovig, Thrombos. Haemost. 40, 89 (1978)

93 Huzoor-Akbar, und N.G. Ardlie, Haemostasis 6, 59 (1977)

94 Huzoor-Akbar, und N.G. Ardlie, Brit. J. Haematol 38, 381 (1978)

95 Ingrisch, H., H. Haendle und E. Werle, in: H.Fritz und H. Tschesche (Hrsg.), Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors, S. 244, de Gruyter, Berlin-New York, 1971

96 Ishikawa, A., R. Hafter, U. Seemüller und H. Graeff, Thrombos. Haemost. 42, 150 (1979)

97 Ishikawa, A., R. Hafter, U. Seemüller, J.M. Gokel und H. Graeff, Thrombos. Res. 19, 351 (1980)

98 Jackson, C.M., C.T. Esmon, S.N. Gitel, W.G. Owen und R.A. Henriksen, in: H.C. Hemker und J.J. Veltkamp (Hrsg.), Prothrombin and Related Coagulation Factors, S. 59, Leiden University Press, Leiden 1975

99 Jacoby, C., Dtsch. med. Wschr. 30, 1786 (1904)

100 Janoff, A., in: K. Havemann und A. Janoff (Hrsg.), Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes, Urban & Schwarzenberg, Baltimore-München, 1978

101 Jochum, M., K. H. Duswald, S. Neumann, J. Witte, H. Fritz und U. Seemüller, in: N. Katunuma et al. (Hrsg.), Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects, 85, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo / Springer Verlag Berlin, 1983

102 Jochum, M., S. Lander, N. Heimburger und H. Fritz, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 362, 103 (1981)

103 Jürgens, R., Z. Ges. exp. Med. 63, 74 (1928)

104 Jutisz, M., A. Charbonnel-Berault und G. Martinoli, Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) 45, 55 (1963)

105 Jutisz, M., G. Martinoli und C. Tertrin, Soc. Chim. biol. (Paris) 44, 461 (1962)

106 Kalkreuth, W. Graf von: Das Verhalten von Humanplasmin gegen Proteaseinhibitoren. Ein Beitrag zur Differenzierung zwischen Humanplasmin und Humanserumkallikrein, Inaugural-Dissertation, Med. Fakultät München, 1972

107 Kang, E.P., und D.C. Triantaphyllopoulos, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 490, 430 (1977)

108 Kaposi, H., Mitteilung aus Grenzgebiet 13, 373 (1904)

109 Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttart-New York, 1980

110 Kisiel, W., und D.J. Hanahan, Biochim. Biophys. Acta 329, 221 (1973)

111 Kisiel, W., und D. J. Hanahan, Biochem. biophysic. Res. Commun. 59, 570 (1974)

112 Kleinfeld, G., und D.V. Habif, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 84, 432 (1953)

113 Klöss, T., W. Lorenz, U. Meyer, U. Mittmann, E. Neugebauer und W.W. Saggau, Langenbecks Arch. Chirurgie, Suppl. 1978, 143

114 Knecht, R., U. Seemüller, M. Liersch, H. Fritz, D.G. Braun und J.Y. Chang, Analytical Biochemistry 130, 65 (1983)

115 Koehler, K.A., und S. Magnusson, Arch. Biochem. Biophysics 160, 175 (1974)

116 Kraut, J., Ann. Rev. Biochem. 46, 331 (1977)

117 Krejci, K., und H. Fritz, FEBS letters 64, 152 (1976)

118 Krejci, K., und W. Machleidt, Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 350, 981 (1969)

119 Kurachi, K., K. Fujikawa, G. Schmer und E.W. Davie, Biochemistry 15, 373 (1976)

120 Lämmle, B., R. Eichlisberger, G.A. Marbet und F. Dukkert, Thromb. Res. 16, 245 (1979)

121 Lagarde, M., P.A. Bryon, M. Guichardant und M. Dechavanne, Thromb. Res. 17, 581 (1980)

122 Landaburu, R.H., M.I. Barnhart und W.H. Seegers, Amer. J. Physiol. 201, 298 (1961)

123 Landaburu, R.H. und W. H. Seegers, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 94, 708 (1957)

124 Landis, W.J., und D.F. Waugh, Arch. Biochem. Biophysics 168, 498 (1975)

125 Landis, B.H., M.P. Zanbinski, G.J.M. Lafleur, D.H. Bing und J.W. Fenton II, Federat. Proc. 37, 1445 (1978)

126 Landmann, H., Folia Haematol (Leipzig) 98, 437 (1972)

127 Laskowski, M. jr., I. Kato, W.J. Kohr in: Versatility of Proteins, Hrsg. C. H. Li, Academic Press, San Francisco, London, pp 307 (1978)

128 Laskowski, M. jr., I. Kato, T.R. Leary, J. Schrode und R.W. Sealock, in: H. Fritz, H. Tschesche, L.S. Greene und E. Truscheit (Hrsg.), Proc. 2nd Int. Research Conference, S. 597, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974

129 Laskowski, M. jr., R.W. Sealock, in: P.D. Boyer (Hrsg.), The Enzymes Vol II, 3rd. Ed., 375, Academic Press, New York-London, 1971

130 Laskowski, M. jr., M. Tashiro, M.W. Empie, S.J. Park, I. Kato, W. Ardelt und M. Wiecczorek, in: N. Katunuma et al. (Hrsg.), Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects, 55, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo / Springer Verlag, Berlin, 1983

131 Latallo, Z.S., und E. Teisseyre, in: I. Witt (Hrsg.), New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromogenic Substrates, S. 181, de Gruyter, Berlin-New York 1977

132 Latallo, Z.S., E. Teisseyre und E. Raczka, in: M.F. Scully und V.V. Kakkar (Hrsg.), Chromogenic Peptide Substrates - Chemistry and Clinical Usage, S. 154, Churchill Livingstone, Edinburgh-London-New York 1977

133 Lee, K.-S., Folia pharmacol. japon. 22, 36 (1936)

134 Lipinski, B., K. Worowski, J. Jeljaszewicz, S. Niewiarowski und L. Rejniak, Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttgart) 20, 285 (1968)

135 Llosa, P. de la, C. Tertrin und M. Jutisz, Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) 45, 69 (1963)

136 Llosa, P. de la, C. Tertrin und M. Jutisz, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 93, 40 (1964)

137 Loeffler, L., Naunyn Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Parmakol. 117, 189 (1926)

138 Löhner, L., Biol. Zentralbl. 35, 385 (1915)

139 Lorand, L., Federat. Proc. 24, 784 (1965)

140 Lushnikowa, E.W., N.W. Fedurkina, E.W. Sokolova, L.J. Krotova und W.W. Mosolow: Methoden moderner Biochemie, Wissenschaft (Originalarbeit, russisch), 5 (1975)

141 MacFarlane, D.E., P.N. Walsh, D.C.B. Mills, H. Holmsen und H.J. Day, Brit. J. Haematol. 30, 457 (1975)

142 Mann, K.G., in: H.C. Hemker und J.J. Veltkamp (Hrsg.), Prothrombin and Related Coagulation Factors, S. 47, Leiden University Press, Leiden 1975

143 Mann, K.H. in: International Series of Monographs on pure and applied Biology, Leeches (Hirudinea), Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris , 1962

144 Markwardt, F., Naturwissenschaften 42, 537 (1955)

145 Markwardt, F., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol 229, 389 (1956)

146 Markwardt, F., Naturwisenschaften 43, 111 (1956)

147 Markwardt, F., Arch. Pharmaz. 290, 280 (1957)

148 Markwardt, F., Hoppe-Seylerś Z. physiol. Chem. 308, 147 (1957)

149 Markwardt, F., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol 232, 487 (1958)

150 Markwardt, F., Blut 4, 161 (1958)

151 Markwardt, F., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol 234, 516 (1958)

152 Markwardt, F., Klin. Wschr. 37, 1142 (1959)

153 Markwardt, F., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol 236, 286 (1959)

154 Markwardt, F., Thrombos. Diathes. haemorrhag (Stuttgart) 5, 576 (1961)

155 Markwardt, F., Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus blutsaugenden Tieren, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1963

156 Markwardt, F., in: G.E. Perlmann und L. Lorand (Hrsg.), Methods in Enzymology, Bd. 19, Proteolytic Enzymes, S. 924, Academic Press, New York-London-San Francisco 1970

157 Markwardt, F., in: H.C. Hemker und J.J. Veltkamp (Hrsg.), Prothrombin and Related Coagulation Factors, S 116, Leiden University Press, Leiden 1975

158 Markwardt, F., in: R. Marx und H. A. Thies (Hrsg.), Kontrolle von Antithrombotika, S. 105, Editiones Roche, Grenzach-Wyhlen 1981

159 Markwardt, F., J. Hauptmann, G. Nowak, Ch. Kleßen und P. Walsmann, Thromb. Haemostas. (Stuttgart) 47 (3), 226 (1982)

160 Markwardt, F., A. Hoffmann und H. Landmann, Thrombos. Diathes. haemorrhag. (Stuttgart) 11, 230 (1964)

161 Markwardt, F., und H. Landmann, Naturwissenschaften 45, 398 (1958)

162 Markwardt, F., und H. Landmann, Naturwissenschaften 48, 433 (1961)

163 Markwardt, F., und H. Landmann, in: F. Markwardt (Hrsg.), Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 27, Anticoagulantien, S. 76, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1971

164 Markwardt, F., und E. Leberecht, Naturwissenschaften 46, 17 (1959)

165 Markwardt, F., G. Nowak und J. Hoffmann, Thromb. Res. 11, 275 (1977)

166 Markwardt, F., G. Schäfer, H. Töpfer und P. Walsmann, Pharmazie 22, 239 (1967)

167 Markwardt, F., und E. Schulz, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol 238, 320 (1960)

168 Markwardt, F., und E. Schulz, Naturwissenschaften 47, 43 (1960)

169 Markwardt, F., und P. Walsmann, Hoppe Seylerś Z. physiol. Chem. 312, 85 (1958)

170 Markwardt, F., und P. Walsmann, Hoppe Seylerś Z. physiol. Chem. 317, 64 (1959)

171 Markwardt, F., und P. Walsmann, Hoppe Seylerś Z. physiol. Chem. 348, 1381 (1967)

172 Markwardt, F., und G. Wenzel, Blut 7, 37 (1961)

173 Mellanby, J., J. physiol. (London) 38, 441 (1909)

174 Miller, K.D., und H. van Vunakis, J. biol. Chemistry 223, 227 (1956)

175 Miller-Andersson, M., und J. Seghatchian, Haemostasis 7, 113 (1978)

176 Möbius, P.G., Fortschritte der Medizin 40, 932 (1934)

177 Moore, S., D.H. Spackman und W.H. Stein, Anal. Chem. 30, 1185 (1958)

178 Morawitz, P., Dtsch. Archiv f. klin. Medizin 79, S. 1, S. 215 und S. 432, (1904)

179 Morita, T., S. Iwanaga und T. Suzuki, J. Biochemistry 79, 1089 (1976)

180 Müller-Berghaus, G., Seminars in Thrombosis and Hemostasis 3:4, 209 (1977)

181 Müller-Berghaus, G., und T. Eckhardt, Blood 45, 631 (1975)

182 Müller-Berghaus, G., D. Goldfinger, W. Margaretten und D.G. McKay, Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttgart), 726 (1967)

183 Müller-Seifert in: H. Frhr. v. Kress (Hrsg.), Taschenbuch der medizinisch - klinischen Diagnostik, 599, J.F. Bergmann Verlag, München, 1966

184 Mustard, J.F., D.W. Perry, R.L. Kinlough-Rathbone und M.A. Packham, Amer. J. Physiol. 228, 1757 (1975)

185 Myrmel, K.H., R.L. Lundblad und K.G. Mann, Biochemistry 15, 1767, (1976)

186 Neal, G. G., und S.I. Chavin, Thromb. Res. 16, 473 (1979)

187 Neal, G. G., und S.I. Chavin, Thrombos. Haemost. 42, 166 (1979)

188 Nedkov, P., und N. Genov, Biochim. Biophys. Acta 127, 541 (1966)

189 Nordstoga, K., Thrombos. Haemostas. (Stuttgart) 37, 180 (1977)

190 Nowak, G., und F. Markwardt, Exp. Pathol. 18, 438 (1980)

191 Odegard, G.R., und M. Lie, Thromb. Res. 12, 697 (1978)

192 Oden, H.G., Mediz. Welt, 273 (1933)

193 Ohlsson, K., Clin. Chim. Acta 32, 399 (1971)

194 Olexa, S.A., und A.Z. Budzynski, Biochemistry 19, 647 (1980)

195 Oronsky, A.L., und C.W. Buermann, in: K. Havemann und A. Janoff (Hrsg.), Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes, 361, Verlag Urban & Schwarzenberg, Baltimore-München, 1978

196 Osterud, R., S.I. Rapaport, S. Schiffman, und M.M.Y. Chong, Brit. J. Haematol. 21, 643 (1971)

197 Penick, G.D., H.R. Roberts und I.I. Dejanov, Fed. Proc. 24, 835 (1965)

198 Petersen, T.E., H.R. Roberts, L. Sottrup-Jensen, S. Magnusson und D. Bagdy, in: H. Peeters (Hrsg.), Protides of Biological Fluids, Bd. 23, S. 145, Pergamon Press, London-New York 1976

199 Pfost, B.: Die Wirkung von Inhibitoren der neutralen Leukozytenproteasen auf das Sanarelli-Shwartzman-Phänomen beim Kaninchen, Inaugural-Dissertation, Universität München, 1980

200 Pitlick, F.A., R.L. Lundblad und E.W. Davie, J. Biomed. Mater. Res. 3, 95 (1969)

201 Rabiet, M.-J., R. Benarous, D. Labie und F. Josso, FEBS Letters 87, 132 (1978)

202 Radcliffe, R., und Y. Nemerson, J. Biol. Chemistry 250/2, 388 (1975)

203 Rapaport, S.I., P.F. Hjort und M.J. Patch, Scand. J. clin. Lab. Invest. 17, Suppl. 84, 88 (1965)

204 Rick, M.E., und L.W. Hoyer, Brit. J. Haematol. 36, 585 (1978)

205 Rick, M.E., und L.W. Hoyer, Brit. J. Haematol. 38, 107 (1977)

206 Riechers, F., Pädiatrie Grenzgeb. 5, 85 (1966)

207 Rimann, H., und W. Wolf, Z. Chirurgie 97, 177 (1908)

208 Roka, L., Hoppe Seylerś Z. physiol. Chem. 323, 145 (1961)

209 Rosenberg, J.S., und D.L. Beeler, R.D. Rosenberg, J. biol. Chemistry 250, 1607 (1975)

210 Rosenberg, R.D., und P.S. Damus, J. biol. Chemistry 248, 6490 (1973)

211 Sahli, Centralblatt für Innere Med. 15, 497 (1894)

212 Schettler, G.: Lehrbuch Innere Medizin, 56, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1980

213 Schiessler, H., M. Arnhold und H. Fritz, in: H. Fritz, H. Tschesche, L.S. Greene und E. Truscheit (Hrsg.), Proc. 2nd Int. Research Conference, S. 147, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974

214 Schiessler, H., M. Arnhold, K. Ohlsson und H. Fritz, Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 357, 1251 (1976)

215 Schiessler, H., W.-D. Schleuning und H. Fritz, Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 356, 1931 (1975)

216 Schiessler, H., K. Ohlsson, I. Ohlsson, M. Arnhold, Y. Birk und H. Fritz, Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 358, 53 (1977)

217 Schittenhelm, A., und A. Bodong, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 54, 217 (1906)

218 Schmidt, W. und K. Havemann, Hoppe- Seylerś Z. Physiol. Chem. 355, 1077 (1974)

219 Schmidt, W., R. Egbring und K. Havemann, Thromb. Res. 6, 315 (1975)

220 Schmutzler, R., und F. Markwardt, Klin. Wschr. 40, 796 (1962)

221 Schramm, W., G. Gröschel, W. Segerer und R. Marx, in: R. Marx und H.A. Thies (Hrsg.), Niere, Blutgerinnung und Haemostase, S. 299, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1978

222 Schremmer, Fr., O. Hromatka, E. Deutsch und C. Csoklich, Mh. Chem. 87, 87 (1956)

223 Schumacher, G.F.B., und L.J.W. Zanefeld, in: H. Fritz, H. Tschesche, L.S. Greene und E. Truscheit (Hrsg.), Proc. 2nd Int. Research Conference, S. 178, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974

224 Schultze, E.: Über die Verwendung von Blutegelextract bei der Transfusion des Blutes, Inaugural-Dissertation, Med. Fakultät Greifswald, 1891

225 Seegers, W.H., G. Casillas, R.S. Shephard, W.R. Thomas und P. Halick, Canad. J. Biochem. 37, 775 (1959)

226 Seegers, W.H., U. Diekamp und L. E. McCoy, Thrombos. Diathes. haemorrhag. (Stuttgart), Suppl. 42, 115 (1970)

227 Seemüller, U.: Inhibitoren aus dem Blutegel Hirudo medizinalis mit Hemmwirkung gegen Chymotrypsin, Subtilisin und die menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G -- Isolierung, Charakterisierung und Studien zum Hemmechanismus, Inaugural-Dissertation, Universität München, 1979

228 Seemüller, U., M. Eulitz und H. Fritz, Methods in Enzymology 80, 804 (1981)

229 Seemüller, U., M. Eulitz, H. Fritz und A. Strobl, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 361, 1841 (1980)

230 Seemüller, U., M. Meier, K. Ohlsson, H.-P. Müller und H. Fritz, Hoppe Seylerś Z. physiol. Chem. 358, 1105 (1977)

231 Seghatchian, M.J., in: M.F. Scully und V.V. Kakkar (Hrsg.), Chromogenic Peptide Substrates - Chemical and Clinical Usage, S. 102, Churchill Livingstone, Edingburgh-London-New York 1979

232 Shah, D.V., J.W. Sutti und G.A. Grant, Arch. Biochem. Biophysic. 159, 483 (1973)

233 Sherry, S., und W. Troll, J. biol. Chemistry, 208, 95 (1953)

234 Shotton, D., in: H.Fritz und H. Tschesche (Hrsg.), Proc. Int. Res. Conf. Proteinase Inhibitors, S. 47, de Gruyter, Berlin-New York, 1971

235 Smith, E.L., F. S. Markland, C.B. Kasper, R.J. DeLange, M. Landon und W.H. Evans, J. of Biol. Chemistry 241, 5974 (1966)

236 Solomon, A., in: K. Havemann und A. Janoff (Hrsg.), Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes, 423, Verlag Urban & Schwarzenberg, Baltimore-München, 1978

237 Solum, N.O., Scand. J. clin. Lab. Invest. 18, 577 (1966)

238 Soulier, J.P., O. Prou-Wartelle und L. Halle, Thrombos. Diathes. haemorrhag. (Stuttgart) 17, 321 (1976)

239 Stambaugh, R., und J. Buckley, Science 161, 585 (1968)

240 Stock, D., E. Diezemann, N. Ell und J. Gottstein, Therapiewoche 29, 2626 (1979)

241 Stocker, K., und G.H. Barlow, in: L. Lorand (Hrsg.), Methods in Enzymology, Bd. 45 B, Proteolytic Enzymes, S. 214, Academic Press, New York-San Francisco-London 1976

242 Stormorken, H., in: M.F. Scully und V.V. Kakkar (Hrsg.), Chromogenic Peptide Substrates - Chemistry and Clinical Usage, S. 32, Churchill Livingstone, Edinburgh-London-New York 1979

243 Straaten, T., Dtsch.Z.Chir. 238, 513 (1933)

244 Sulger, E., und T. Bozsin, Dtsch. Z. Chir. 216, 175 (1928)

245 Suomela, H., Thromb. Res. 7, 101 (1975)

246 Sutor, A.H., S. Knop und D. Adler, in: R. Marx und H.A. Thies (Hrsg.), Kontrolle von Antithrombotika, Editiones "Roche", 117 (1981)

247 Svendsen, L., in: I. Witt (Hrsg.), New Methods for the Analysis of Coagulation Using Cromogenic Substrates, de Gruyter, Berlin-New York 1977

248 Svendsen, L., in: M.F. Scully und V.V. Kakkar (Hrsg.), Chromogenic Peptide Substrates - Chemistry and Clinical Usage, S. 13, Churchill Livingstone, Edinburgh-London-New York 1979

249 Svendsen, L., und K. Stocker, in: I. Witt (Hrsg.), New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromogenic Substrates, S. 23, de Gruyter, Berlin-New York 1977

250 Tam, S.W., J.W. Fenton II und T.C. Detwiler, J. biol. Chemistry 254, 8723 (1979)

251 Teichler, I., Zur Diagnostik hämorrhagischer Diathesen mit Hilfe des Hirudintoleranztestes, Inaugural-Dissertation, Med. Akademie Erfurt 1965

252 Termier, M., La Presse Medicale 30, 888 (1922)

253 Termier, M., La Presse Medicale 35, 1302 (1927)

254 Tertrin, C., P. de la Llosa und M. Jutisz, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 124, 380 (1966)

255 Tertrin, C., P. de la Llosa und M. Jutisz, Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) 49, 1837 (1967)

256 Triantaphyllopoulos, D.C., Thrombos. Haemost. 42, 838 (1979)

257 Triantaphyllopoulos, D.C., und E.P. Kang, Thrombos. Haemost. 39, 243 (1978)

258 Triebel, H., und P. Walsmann, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 120, 137 (1966)

259 Tronnier, H., Hautarzt 20, 114 (1969)

260 Tschesche, H., S. Kupfer, O. Lengel und R. Klauser, in: in: H. Fritz, H. Tschesche, L.S. Greene und E. Truscheit (Hrsg.), Proc. 2nd Int. Research Conference, S. 164, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974

261 Tschesche, H., und E. Wachter, Eur. J. Biochem. 16, 187 (1970)

262 Vinazzer, H.: Die postoperative Thrombosebereitschaft S. 16, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1969

263 Vogel, R., J. Trautschold, E. Werle in: Natürliche Proteinasen-Inhibitoren, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1966

264 Waldschmidt-Leitz, E., P. Stadler und F. Steigerwaldt, Hoppe Seylerś Z. physiol. Chem. 183, 39 (1929)

265 Walker, F.J., W.G. Owen und C.T. Esmon, Biochemistry 19, 102 (1980)

266 Walsmann, P., Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Thrombinhemmstoffe, Dissertation, Universität Greifswald 1960

267 Walsmann, P., Blut 10, 203 (1964)

268 Walsmann, P., und F. Markwardt, Pharmazie 36, 653 (1981)

269 Walsmann, P., M. Richter und F. Markwardt, Acta biol. med. german. 28, 577 (1972)

270 Walsmann, P., und G. Vogel, Folia haematol. (Leipzig) 94, 143 (1970)

271 Wamhoff, D., Folia haematol. (Leipzig) 102, 82 (1975)

272 Wenzel, G.: Beiträge zur Diagnostik der Gerinnungsstörungen und zur Überwachung der Behanlung mit Antikoagulantien mit Hilfe des Hirudin, Inaugural-Dissertation, Med. Fakultät der Universität Greifswald, 1960

273 Wijk, E.M. van, L.H. Kahle und J.W. ten Cate, Thrombos. Haemost. 42, 56 (1979)

274 Woods, K.R., und K.T. Wang, Biochim. Biophys. Acta 133, 369 (1967)

275 Woziwodzki, G., Zbl. Chirurg. 94, 450 (1969)

276 Yanagisawa, H., und E. Yokoi, Proc. Imp. Acad. (Tokyo) 14, 69 (1938)

277 Zaneveld, L.J.D., G.F.B. Schumacher, P.F. Tauber und D. Propping, in: H. Fritz, H. Tschesche, L.S. Greene und E. Truscheit (Hrsg.), Proc. 2nd Int. Research Conference, S. 136, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974

278 Zanefeld, L.J.D., K.L.Polakoski, R.T. Robertson und W.L. Williams, in: H.Fritz und H. Tscheche (Hrsg.), Proc. Int. Res. Conf. Proteinase Inhibitors, S. 236, de Gruyter, Berlin-New York, 1971

279 Zick, K., Zoologischer Anzeiger 96, Nr. 11/12, 328 (1931)

280 Zick, K., Zoologischer Anzeiger 103, Nr. 3/4, 51 (1933)

281 Zwilling, R., Hoppe Seylerś Z. physiol. Chem. 349, 1787 (1968)

Ergänzungen:

282 Chang, J.-Y., R. Knecht, D. G. Braun, Biochem. J. 211, 163 (1983)

283 Edman, P., G. Begg, Eur. J. of Biochem. 1, 80 (1967)

284 Johnson, D., J. Travis, J. of Biological Chemistry 253, No. 20, 7142 (1978)

285 Marx, R., Fortschritte der Medizin, 10, 603 (1977)

286 Seegers, W. H., H. Schröer, D. Heene, Thrombos. Diathes. haemorrhag. (Stuttgart) 12, 484 (1964)

287 Walsmann, P., Pharmazie 36, H. 12 (1981)

Herrn Prof. Dr. Hans Fritz möchte ich für die Überlassung des Themas und die persönliche Unterstützung bei der Ausarbeitung danken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Ursula Seemüller für ihren fachkundigen Rat und ihre Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Name:	Carola Barbara Jopen-Wolff, geb. Wolff
Geburtstag:	23.5.1941
Geburtsort:	Dresden
Eltern:	Dr. med. Albert Wolff Dr. med. Carola Wolff, geb. Krumbiegel
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung:

1947 - 1950	Volksschule in Bad Harzburg und Camberg/Taunus
1950 - 1951	Rio de Janeiro und Juiz de Fora/Brasilien
1952 - 1959	Naturwissenschaftliches Gymnasium in Juiz de Fora/Brasilien
12.12.59	Reifeprüfung
22.10.65	Prüfung für deutsche Inhaber ausländischer Bildungsnachweise in München

Ausbildung und Erwerbstätigkeit:

1960	Berufsfachlehrgang für fremdsprachliche Korrespondentinnen in Bad Harzburg
1960 - 1961	Sprachenstudium (Englisch und Französich) an der Philosophischen Fakultät der Universität Hamburg
1962 - 1965	Erwerbstätigkeit als kaufmännische Angestellte in München

Studium der Medizin:

1965 - 1969	Medizinische Fakultät der Universität zu Köln
29.03.69	Ärztliche Vorprüfung an der Universität zu Köln
1969 - 1972	Medizinische Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
20.10.72	Ärztliche Prüfung an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

Berufstätigkeit:

1973	Medizinalassistentin in der Inneren Abteilung des Johanniter Krankenhauses in Rheinhausen
16.05.74	Approbation als Ärztin
1974 1974 - 1980	Medizinalassistentin und Assistenzärztin in der Chirurgischen Abteilung des St. Franziskus-Hospitals in Flensburg
Frühjahr 1982	Beginn der vorliegenden Arbeit